

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
CAMPUS: JARDIM BOTÂNICO

OTTONIA MARTIANA MIQ., PIPERACEAE: UM ESTUDO FITOQUÍMICO
COM ENFOQUE MULTIDISCIPLINAR

MIRIAM MACHADO CUNICO

Orientador: Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel.
Co-Orientadores: Prof^a Dr^a Marilis Dallarmi Miguel,
Prof. Dr. Celso Garcia Auer.

CURITIBA - PR
2007

MIRIAM MACHADO CUNICO

**OTTONIA MARTIANA MIQ., PIPERACEAE: UM ESTUDO FITOQUÍMICO
COM ENFOQUE MULTIDISCIPLINAR**

**CURITIBA
2007**

MIRIAM MACHADO CUNICO

**OTTONIA MARTIANA MIQ., PIPERACEAE: UM ESTUDO FITOQUÍMICO
COM ENFOQUE MULTIDISCIPLINAR**

Tese apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Doutor em Ciências
Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da
Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Dr. Obdulio Gomes Miguel.
Co-Orientadores: Dr^a Marilis Dallarmi Miguel.
Dr. Celso Garcia Auer.

**CURITIBA
2007**

TERMO DE APROVAÇÃO

MIRIAM MACHADO CUNICO

OTTONIA MARTIANA MIQ., PIPERACEAE: UM ESTUDO FITOQUÍMICO
COM ENFOQUE MULTIDISCIPLINAR

Tese aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, por meio da seguinte banca examinadora:

Orientador: Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel
Departamento de Farmácia, UFPR.

Prof. Dr. Alexandre Bella Cruz
Departamento de Microbiologia, UNIVALI.

Prof^a. Dr^a. Sandra M. W. Barreira
Departamento de Síntese Orgânica, UFPR.

Prof. Dr. Carlos I. Yamamoto
Departamento de Engenharia Química (PIPE), UFPR.

Prof. Dr. Valdir Cechinel Filho
Departamento de Química, UNIVALI.

Curitiba, 14 de dezembro de 2007.

Oração de São Francisco

Senhor,
Fazei de mim um instrumento de vossa paz!
Onde houver ódio, que eu leve o amor.
Onde houver ofensa, que eu leve o perdão.
Onde houver dúvida, que eu leve a fé.
Onde houver erro, que eu leve a verdade.
Onde houver desespero, que eu leve a esperança.
Onde houver tristeza, que eu leve a alegria.
Onde houver treva, que eu leve a luz!
Ó Mestre, fazei com que eu procure mais
Consolar do que ser consolado,
Compreender do que ser compreendido,
Amar do que ser amado.
Pois é dando que se recebe,
Perdoando que se é perdoado,
E é morrendo que se vive para a vida eterna!

Amém

FONTE: OLIVEIRA (2007)

E disse Deus: Produza a terra erva verde, erva que dê semente, árvore frutífera que dê fruto segundo a sua espécie, cuja semente está nela sobre a terra; e assim foi".(Gênesis 1:11)

"E a terra produziu erva, erva dando semente conforme a sua espécie, e a árvore frutífera, cuja semente está nela conforme a sua espécie; e viu Deus que era bom".(Gênesis 1:12)

"E disse Deus: Eis que vos tenho dado toda a erva que dê semente, que está sobre a face de toda a terra; e toda a árvore, em que há fruto que dê semente, ser-vos-á para mantimento".(Gênesis 1:29)

"E a todo o animal da terra, e a toda a ave dos céus, e a todo o réptil da terra, em que há alma vivente, toda a erva verde será para mantimento; e assim foi".(Gênesis 1:30)

"E junto ao rio, à sua margem, de um e de outro lado, nascerá toda a sorte de árvore que dá fruto para se comer; não cairá a sua folha, nem acabará o seu fruto; nos seus meses produzirá novos frutos, porque as suas águas saem do santuário; e o seu fruto servirá de comida e a sua folha de remédio" (Ezequiel 47:12)

A Deus, autor da dádiva maior: a vida,

MINHA ETERNA GRATIDÃO

*"Por que o Senhor dá a sabedoria; da Sua boca vem o conhecimento e o entendimento."
(Provérbios 2:6)*

*"O Senhor produziu da terra os medicamentos; o homem sensato não os desprezará."
(Eclesiastes 39: 4)*

Aos meus pais Hercílio (*in memoriam*) e Jocelina,
Exemplos de vida e de valiosos conselhos,

DEDICO

*"Quanto a você, porém, permaneça nas coisas que aprendeu e das quais tem convicção, pois você sabe de quem aprendeu. Porque desde criança você conhece as Sagradas letras que são capazes de torná-lo sábio para salvação, mediante a fé em Cristo Jesus."
(2 Timóteo 3: 14,15)*

Ao meu esposo Edimar, companheiro e amigo nos sonhos e realizações, e aos meus filhos Marlon e Malton, fonte de minha inspiração,

OFEREÇO

*Mais vale dois que um só, porque terão proveito do seu trabalho. Porque se caem um levanta o outro; mas o que será de alguém que cai sem ter um companheiro para levantá-lo?
(Eclesiastes 4:9-10)*

Aos amigos João Luiz S. Carvalho, Lílian Cristina Côcco e Rosinha Nitoko.

MINHA ETERNA AMIZADE

*Amizade não é receber, é dar.
Não é magoar, é incentivar
Não é descrer, é crer.
Não é criticar, é apoiar.*

*Não é ofender, é compreender.
Não é humilhar, é defender.
Não é julgar, é aceitar.*

*Não é esquecer, é perdoar.
AMIZADE...é simplesmente
"AMAR".
(Autor desconhecido)*

Aos professores Obdulio Gomes Miguel, Marilis D. Miguel e Celso G. Auer.

MINHA ADMIRAÇÃO E RESPEITO

*"Nunca ande pelo caminho traçado,
ele leva onde os outros já foram".
(Graham Bell)*

*"Algo só é impossível até que alguém duvide e
prove o contrário"
(Albert Einstein)*

*"Não há nada de nobre em sermos superiores ao
próximo. A verdadeira nobreza consiste em sermos
superiores ao que éramos antes".
(Autor desconhecido)*

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Paraná, por receber-me em sua ilustre casa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Aos professores, funcionários e colegas do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, que de alguma maneira estiveram envolvidos na minha caminhada.

À Prof^a Cristina Leise Bastos Monteiro (laboratório de Patologia Básica da UFPR), pela cooperação na avaliação da atividade antimicrobiana.

Às Dr^{as} Marta Regina Tazoniero do Amaral e Carmem Etsuko Kataoka (Tecpar), pelo fornecimento das cepas de bactérias com ATCC.

À Embrapa-Floresta (Laboratório de Fitopatologia), pelos isolados dos fitopatógenos.

Aos amigos Álvaro Lenzi, Paulo Martimiano Dias e familiares, por disponibilizarem o acesso ao material vegetal da *Ottonia martiana*.

Ao Botânico Gerdt Hatschbach (MBM), pela identificação da espécie vegetal.

Às amigas Klézia Moraes da Silva Belletti, Hilda Aparecida dos Santos e Cristina Peitz, pela ajuda, consideração e apoio nos momentos difíceis.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização e divulgação deste trabalho.

Em especial:

Ao Prof. Dr. Carlos Yamamoto (Coordenador do Laboratório LACAUT - UFPR), M.Sc. LÍlian Cristina Côcco (Pesquisadora do LACAUT - UFPR), M.Sc. André Romualdo Lopes (Químico do LACAUT - UFPR) e João Luiz de Souza Carvalho (Laboratório de Fitoquímica - UFPR), pela valiosa contribuição na pesquisa analítica.

À Prof^a Izabel Gallardi (*in memorian*) e Bioquímica Rosinha Nikoto, pela disposição em ajudar-me nas avaliações antimicrobianas.

Ao Dr. Albino Grigoletti Júnior (Laboratório de Fitopatologia da Embrapa-Floresta), pela ajuda na avaliação antifúngica.

Ao Prof. Dr. Herbert Arlindo Trebian (Dep. Farmacologia – UFPR), pela valiosa contribuição na pesquisa farmacológica.

NOTA BIOGRÁFICA

A autora graduou-se em Licenciatura em Ciências, habilitação em Química e em Bacharelado em Química pela Universidade Católica do Paraná em 1984. Em seguida, atuou como professora de química em vários colégios particulares, sendo atualmente professora efetiva da SEED-PR.

No decorrer deste período, especializou-se em Metodologia da Ciência com Habilitação ao Magistério Superior pela Faculdade de Ciências Humanas e Sociais de Curitiba (1995), em Farmacologia pela Universidade Federal do Paraná (1997) e em Educação de Jovens e Adultos pela Faculdade Curitiba (2005).

Em 2001 recebeu o título de Mestre em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná, onde desenvolveu um estudo fitoquímico e das atividades antimicrobianas da *Ottonia martiana* Miq., Piperaceae.

Em 2007 recebeu do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná o título de Doutora, onde desenvolveu um estudo fitoquímico com enfoque multidisciplinar da espécie *Ottonia martiana* Miq., Piperaceae, cujos resultados estão contidos neste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xiv
LISTA DE TABELAS E QUADROS.....	xvii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xix
RESUMO.....	xxi
ABSTRACT.....	xxii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. OBJETIVO GERAL.....	4
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	6
2.1. PRODUTOS NATURAIS	6
2.1.1. INTERAÇÕES ENTRE SERES VIVOS	7
2.1.1.1. INTERAÇÃO PLANTA-ANIMAL.....	7
2.1.1.2. INTERAÇÃO INSETO-INSETO.....	8
2.1.1.3. INTERAÇÃO PLANTA-PLANTA.....	9
2.1.1.4. INTERAÇÃO PLANTA-MICRORGANISMOS.....	10
2.1.1.5. INTERAÇÃO ANIMAL-ANIMAL.....	11
2.1.2. FITOQUÍMICA MULTIDISCIPLINAR....	13
2.2. FAMÍLIA PIPERACEAE	15
2.2.1. GÊNERO <i>Ottonia</i>	18
2.2.1.1. ASPECTOS ETNOBOTÂNICOS DE ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Ottonia</i>	18
2.2.1.2. ASPECTOS FITOQUÍMICOS DE ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Ottonia</i>	20
2.2.1.3. ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE EXTRATOS E SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Ottonia</i>	23
2.2.2. ESPÉCIE <i>O. martiana</i>	25
2.2.2.1. ASPECTOS BOTÂNICOS E ETNOBOTÂNICOS DA <i>O. martiana</i>	25
2.2.2.2. ASPECTOS FITOQUÍMICOS DA <i>O. martiana</i>	29
2.2.2.3. ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA <i>O. martiana</i>	30
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1. MATERIAL, INSTRUMENTAÇÃO E MÉTODOS GERAIS	31
3.2. OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL	34
3.3. EXTRAÇÃO, PARTICIONAMENTO E ISOLAMENTO DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS.....	35

3.3.1. OBTENÇÃO E PARTICIONAMENTO DO EBETOH DOS ÓRGÃOS TOTAIS (COLETA 2002)	35
3.3.2. OBTENÇÃO E PARTICIONAMENTO DO EBETOH DOS FRUTOS DE <i>O. martiana</i> , PARTICIONAMENTO E ISOLAMENTO DE SUBSTÂNCIAS	37
3.3.3. OBTENÇÃO DO EBETOH DAS RAÍZES DE <i>O. martiana</i> , PARTICIONAMENTO E ISOLAMENTO DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS.....	39
3.3.4. OBTENÇÃO DO EBETOH DOS CAULES DE <i>O. martiana</i> , PARTICIONAMENTO E ISOLAMENTO DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS.....	41
3.3.5. EXTRAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS.....	42
3.4. CARACTERIZAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS E IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS.....	43
3.5. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA.....	44
3.5.1. TESTE DE DIFUSÃO EM ÁGAR.....	45
3.5.1.1 DISCOS DE PAPEL.....	45
3.5.1.2. CAVIDADE EM CAMADA DUPLA (POÇO).....	46
3.5.1.3. BIOAUTOGRAFIA.....	48
3.6. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA.....	50
3.6.1. TESTE DA INFLUÊNCIA DO EBETOH SOBRE O CRESCIMENTO MICELIAL.....	50
3.6.2. TESTE DE GERMINAÇÃO DE ESPOROS.....	52
3.6.3. TESTE <i>in vivo</i>	53
3.6.3.1. TESTE DA LESÃO FOLIAR EM FOLHAS DESTACADAS	53
3.6.3.2. TESTE EM MUDAS DE ERVA-MATE E EUCALIPTO	55
3.6.4. BIOAUTOGRAFIA DIRETA.....	56
3.6.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	58
3.7. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA	58
3.7.1.DETERMINAÇÃO DO EFEITO ALELOPÁTICO SOBRE SEMENTES DE <i>L. sativa</i>	58
3.7.2.TESTE DE GERMINAÇÃO DE SEMENTES.....	59
3.7.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	61
3.8. AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA.....	61
3.8.1. ENSAIO DA IRRITAÇÃO DA MUCOSA ORAL.....	62
3.8.2. TESTE GERAL DE ATIVIDADE (TOXICIDADE AGUDA, TESTE HIPOCRÁTICO, RASTREAMENTO DAS DOSES E DL ₅₀).....	64
3.8.3. ANESTESIA TÓPICA EM Córnea de COELHOS.....	65

3.8.4. MÉTODO DA ANESTESIA INTRADÉRMICA.....	66
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	68
4.1. EXTRAÇÃO PARTICIONAMENTO E ISOLAMENTO DE SUBSTÂNCIAS.....	68
4.1.1. EXTRAÇÃO	68
4.1.2. PARTICIONAMENTO	69
4.1.3. SUBSTÂNCIAS E ÓLEOS ESSENCIAIS.....	70
4.2. IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS.....	76
4.2.1. OMA1	76
4.2.2. OMA2	83
4.2.2.1. OMA2A, OMA2B, OMA2C E OMA2D.....	92
4.2.3. OMA3	95
4.2.4. OMA4	96
4.2.5. OMA5	97
4.2.6. OMA6	99
4.2.7. OMA7	101
4.2.8. OMA8	103
4.2.9. OMA9	105
4.2.10. OMA10	106
4.2.11. OMA11	108
4.3. CARACTERIZAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS	115
4.4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA.....	119
4.4.1. MICROBIOTA ORAL HUMANA	119
4.4.2. MICRORGANISMOS RELACIONADOS A INFECÇÕES NOSOCOMIAIS	123
4.4.3. POTENCIAL ANTIMICROBIANO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS	124
4.5. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA.....	127
4.5.1. INFLUÊNCIA DO EBEtOH SOBRE O CRESCIMENTO MICELIAL	127
4.5.2. BIOAUTOGRAFIA DIRETA	130
4.5.3. TESTE DE GERMINAÇÃO DE ESPOROS	131
4.5.4. TESTE EM FOLHAS DESTACADAS	133
4.5.5. TESTE EM MUDAS DE ERVA-MATE E EUCALIPTO	136

4.6. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA	139
4.7. AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA.....	143
4.7.1. TESTE GERAL DE ATIVIDADE, TESTE HIPOCRÁTICO, TOXICIDADE AGUDA E DL ₅₀	143
4.7.2. ENSAIO DA IRRITAÇÃO DA MUCOSA ORAL.....	145
4.7.3. ANESTESIA TÓPICA. EM Córnea de coelho.....	146
4.7.4. ANESTESIA INTRADÉRMICA	147
5. CONCLUSÃO	157
5.1. CONSIDERAÇÕES FINAIS	159
REFERÊNCIAS.....	160

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	ESTRUTURA QUÍMICA DO GLICOSÍDIO CIANOGENÍCO	8
FIGURA 2 -	ESTRUTURA QUÍMICA DO ALOMÔNIO JUGLONA	10
FIGURA 3 -	ESTRUTURA QUÍMICA DE FITOALEXINAS.....	11
FIGURA 4 -	ESTRUTURA QUÍMICA DO ESTERÓIDE 5- α -ANDROST-16-EN-3- α -OL.....	12
FIGURA 5 -	ESQUEMA DA CLASSIFICAÇÃO DOS SEMIOQUÍMICOS.....	13
FIGURA 6 -	PRINCIPAIS CLASSES DE PN ISOLADOS DE PIPERACEAE E SUAS ESTRUTURAS BÁSICAS.....	17
FIGURA 7 -	ALGUNS ASPECTOS MORFOLÓGICOS DA <i>O. martiana</i>	28
FIGURA 8 -	INFLORESCÊNCIA DA <i>O. martiana</i> .EXIBINDO SUAS FLORES MIÚDAS	29
FIGURA 9 -	FLUXOGRAMA DA OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO DOS ÓRGÃOS TOTAIS E DE SUAS FASES.....	36
FIGURA 10 -	SOXHLET MODIFICADO	37
FIGURA 11 -	FLUXOGRAMA DA EXTRAÇÃO E PARTICIONAMENTO DO EXTRATO OBTIDO DOS FRUTOS DE <i>O. martiana</i>	39
FIGURA 12 -	FLUXOGRAMA DA OBTENÇÃO DO EXTRATO DAS RAÍZES DE <i>O. martiana</i> E DE SUAS FASES.....	40
FIGURA 13 -	FLUXOGRAMA DA EXTRAÇÃO, PARTICIONAMENTO E ISOLAMENTO DE SUBSTÂNCIAS PRESENTES NOS CAULES DE <i>O. martiana</i>	41
FIGURA 14 -	CLEVENGER MODIFICADO	42
FIGURA 15 -	FLUXOGRAMA DA EXTRAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS FOLHAS, FRUTOS E RAÍZES DE <i>O. martiana</i>	43
FIGURA 16 -	HALOS DE INIBIÇÃO EM TESTE ANTIMICROBIANO DE DIFUSÃO EM ÁGAR (DISCOS DE PAPEL).....	46
FIGURA 17 -	ETAPAS DO TESTE ANTIMICROBIANO DE DIFUSÃO EM ÁGAR (CAVIDADES EM GEL)	48
FIGURA 18 -	BIOAUTOGRAMAS COM ZONAS DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO DE <i>S.aureus</i>	49
FIGURA 19 -	VISUALIZAÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL (<i>IN VITRO</i>) DE <i>G. cingulata</i> FRENTE A EXTRATOS VEGETAIS	51
FIGURA 20 -	MICROMORFOLOGIA DOS FITOPATÓGENOS <i>C. spathulatum</i> E <i>B. cinerea</i> ..	53
FIGURA 21 -	LESÃO EM FOLHA DESTACADA DE ERVA-MATE CAUSADA POR <i>C. spathulatum</i>	54

FIGURA 22 - ETAPAS DO ENSAIO ANTIFÚNGICO EM MUDAS DE ERVA-MATE.....	56
FIGURA 23 - BIOAUTOGRAFIA DIRETA DE EXTRATOS DE FOLHAS DE PLANTAS MEDICINAIS DO HIMALAIA.....	57
FIGURA 24 - CRESCIMENTO RADICULAR E DE HIPOCÓTILOS DE PLÂNTULAS DE ALFACE	59
FIGURA 25 - ETAPAS DO BIOENSAIO ALELOPÁTICO DE GERMINAÇÃO DE SEMENTES	60
FIGURA 26 - ANIMAIS EMPREGADOS NOS TESTES FARMACOLÓGICOS	61
FIGURA 27 - FLUXOGRAMA DA OBTENÇÃO DE OMA1..	71
FIGURA 28 - FLUXOGRAMA DA OBTENÇÃO DE OMA2, OMA3, OMA4, OMA5, OMA6, OMA7 E OMA8.....	72
FIGURA 29 - FLUXOGRAMA DA OBTENÇÃO DE OMA9, OMA10 E OMA11.....	73
FIGURA 30 - FLUXOGRAMA DA OBTENÇÃO DE OMA12, OMA13 E OMA14.....	74
FIGURA 31 - CROMATOGRAMA E ESPECTRO DE MASSAS DO ISOLADO OMA1.....	76
FIGURA 32 - FRAGMENTOS ATRIBUÍDOS AOS PICOS PRINCIPAIS EXIBIDOS NO ESPECTRO DE MASSAS DO ISOLADO OMA1.....	77
FIGURA 33 - ESPECTROS DE RMN DE ^1H DO ISOLADO OMA1 OBTIDO DO EBEtOH DOS FRUTOS DE <i>O. martiana</i>	78
FIGURA 34 - ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C E DEPT 135° DO ISOLADO OMA1 OBTIDO DO EBEtOH DOS FRUTOS DE <i>O. martiana</i>	80
FIGURA 35 - CROMATOGRAMA DO ISOLADO OMA2 OBTIDO DO EBEtOH DAS RAÍZES DE <i>O. martiana</i>	83
FIGURA 36 - ESPECTROS DE MASSAS DOS CONSTITUINTES (PICOS 2, 3, 4 E 5) DE OMA2 OBTIDO DO EBEtOH DAS RAÍZES DE <i>O. martiana</i>	84
FIGURA 37 - ESPECTROS DE RMN DE ^1H DO ISOLADO OMA2 OBTIDO DO EBEtOH DAS RAÍZES DE <i>O. martiana</i>	87
FIGURA 38 - ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C DO ISOLADO OMA2 OBTIDO DO EBEtOH DAS RAÍZES DE <i>O. martiana</i>	88
FIGURA 39 - CROMATOGRAMAS DOS ISOLADOS OMA2, OMA2A, OMA2B, OMA2C E OMA2D OBTIDOS DO EBEtOH DAS RAÍZES DE <i>O. martiana</i>	93
FIGURA 40 - CROMATOGRAMA E ESPECTRO DE MASSAS DO ISOLADO OMA3.....	95
FIGURA 41 - CROMATOGRAMA E ESPECTRO DE MASSAS DO ISOLADO OMA4	96
FIGURA 42 - CROMATOGRAMA E ESPECTRO DE MASSAS DO ISOLADO OMA5	98
FIGURA 43 - CROMATOGRAMA E ESPECTRO DE MASSAS DO ISOLADO OMA6(9)(10) ..	99
FIGURA 44 - CROMATOGRAMA E ESPECTRO DE MASSAS DOS CONSTITUINTES DO ISOLADO OMA7	101

FIGURA 45 - DIFRATOGRAMA DO PRECIPITADO OMA8(13) DA FASE ACETATO DE ETILA OBTIDA DO EXTRATO DAS RAÍZES DE <i>O. martiana</i>	104
FIGURA 46 - DIFRATOGRAMA DO PRECIPITADO OMA9(14) OBTIDO DO EBEtOH DOS CAULES DE <i>O. martiana</i>	106
FIGURA 47 - DIFRATOGRAMA DO PRECIPITADO OMA10(15) OBTIDO DO EBEtOH DOS CAULES DE <i>O. martiana</i>	107
FIGURA 48 - CROMATOGRAMA E ESPECTRO DE MASSAS DO ISOLADO OMA11(16)(17) OBTIDO DOS CAULES DE <i>O. martiana</i>	108
FIGURA 49 - ESPECTROS DE RMN DE ¹ H DO ISOLADO OMA11 OBTIDO DO EBEtOH DOS CAULES DE <i>O. martiana</i>	110
FIGURA 50 - ESPECTROS DE RMN DE ¹³ C DO ISOLADO OMA11 OBTIDO DO EBEtOH DOS CAULES DE <i>O. martiana</i>	112
FIGURA 51 - BIOAUTOGRAMAS EXIBINDO ZONAS DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO BACTERIANO	122
FIGURA 52 - BIOAUTOGRAFIA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE <i>O. martiana</i>	126
FIGURA 53 - CRESCIMENTO MICELIAL DO <i>C. spathulatum</i> E <i>B. cinerea</i> FRENTE AO EBEtOH DOS ÓRGÃOS TOTAIS DE <i>O. martiana</i>	128
FIGURA 54 - VISUALIZAÇÃO DAS ZONAS DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO FÚNGICO NOS BIOAUTOGRAMAS ENSAIADOS.....	130
FIGURA 55 - VISUALIZAÇÃO MICROSCÓPICA DA GERMINAÇÃO DOS CONÍDIOS DE <i>B. cinerea</i> EM ÁGUA ESTÉRIL.....	133
FIGURA 56 - EFEITO DO EXTRATO DE <i>O. martiana</i> FRENTE AOS FITOPATÓGENOS <i>C. spathulatum</i> E <i>B. cinerea</i> EM FOLHAS DESTACADAS DE ERVA-MATE E EUCALIPTO, RESPECTIVAMENTE.....	134
FIGURA 57 - EFEITO ANTIFÚNGICO DO EBEtOH DE <i>O. martiana</i> NO CONTROLE DA PINTA-PRETA EM MUDAS DE ERVA-MATE E DO MOFO-CINZENTO EM MUDAS DE EUCALIPTO.....	138
FIGURA 58 - DL ₅₀	144
FIGURA 59 - ANESTESIA TÓPICA EM Córnea de COELHOS.....	147
FIGURA 60 - REFLEXO CUTÂNEO EM COBAIAS TRATADAS COM EBEtOH DE <i>O. martiana</i>	148
FIGURA 61 - ESTRUTURAS QUÍMICAS DE ALGUNS ANESTÉSICOS LOCAIS.....	150
FIGURA 62 - ESTRUTURA QUÍMICA DAS SUBSTÂNCIAS LIDOCAÍNA E PIPEROVATINA.	151
FIGURA 63 - ESTRUTURA QUÍMICA DAS SUBSTÂNCIAS CAPSAICINA E PIPEROVATINA	152
FIGURA 64 - REFLEXO CUTÂNEO EM COBAIAS TRATADAS COM FASES DO EBEtOH DE <i>O. martiana</i>	155

LISTA DE TABELAS E QUADROS

TABELA 1 - FEROMÔNIOS DE AGREGAÇÃO DE DIFERENTES ESPÉCIES DE <i>Rhynchophorus</i> APRESENTADOS ESTRUTURALMENTE EM SUA FORMA RACÊMICA.....	9
TABELA 2 - ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO DA <i>O. martiana</i>	26
TABELA 3 - CLASSIFICAÇÃO DO PRODUTO ANALISADO EM RELAÇÃO AO VALOR DA MÉDIA FINAL PARA MUCOSA ORAL E JUNÇÃO LABIAL.....	64
TABELA 4 - EXTRATOS E ÓLEOS ESSENCIAIS OBTIDOS DA <i>Ottonia martiana</i>	69
TABELA 5 - RENDIMENTO DAS FASES OBTIDAS DOS EXTRATOS BRUTOS ETANÓLICOS DA <i>Ottonia martiana</i>	70
TABELA 6 - SUBSTÂNCIAS E ÓLEOS ESSENCIAIS OBTIDOS DE <i>Ottonia martiana</i>	75
TABELA 7 - RMN- ¹³ C (50 MHz, CDCl ₃), DEPT 135 ⁰ E RMN- ¹ H (200 MHz, CDCl ₃) DE OMA1	81
TABELA 8 - DADOS DE RMN- ¹³ C (50 MHz, CDCl ₃), RMN- ¹ H (200 MHz, CDCl ₃) E DEPT 135 ⁰ DO ISOLADO OMA2.....	89
TABELA 9 - DADOS DA ANÁLISE DE DIFRAÇÃO DE RAIOS-X DO PRECIPITADO OMA8(13).....	103
TABELA 10 - DADOS DA ANÁLISE DE DIFRAÇÃO DE RAIOS-X DO PRECIPITADO OMA9(14).....	105
TABELA 11 - DADOS DA ANÁLISE DE DIFRAÇÃO DE RAIOS-X DO PRECIPITADO OMA10(15).....	106
TABELA 12 - RMN- ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) E DEPT 135 ⁰ DA MISTURA DE ESTERÓIDES DO ISOLADO OMA11.....	114
TABELA 13 - COMPOSIÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS EXTRAÍDOS DA <i>O. martiana</i>	116
TABELA 14 - RESULTADOS DA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA POR DIFUSÃO EM ÁGAR DO EBETOH DE <i>O. martiana</i>	121
TABELA 15 - MEDIDAS DOS HALOS DE INIBIÇÃO (mm) DOS EBETOH DAS RAÍZES E PARTES AÉREAS DE <i>O. martiana</i> CONTRA <i>E. faecium</i> , <i>E. aerogenes</i> E <i>P. aeruginosa</i>	123
TABELA 16 - VALORES DE R _f DAS ISOBUTILAMIDAS ISOLADAS DE <i>O. martiana</i>	124
TABELA 17 - ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS EXTRAÍDOS DE <i>O. martiana</i>	125
TABELA 18 - INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO MICELIAL (%) DE <i>C. spathulatum</i> E <i>B. cinerea</i>	127
TABELA 19 - INIBIÇÃO DA GERMINAÇÃO DE ESPOROS (%) DE <i>C. spathulatum</i> E <i>B. cinerea</i>	132

TABELA 20 - INIBIÇÃO DE LESÕES FOLIARES (%) DE <i>O. martiana</i> , <i>IN VIVO</i> , CAUSADAS POR <i>C. spathulatum</i>	135
TABELA 21 - INIBIÇÃO DE LESÕES FOLIARES (%) DE <i>O. martiana</i> , <i>IN VIVO</i> , CAUSADAS POR <i>B. cinerea</i>	136
TABELA 22 - SINTOMAS APRESENTADOS PELAS MUDAS DE ERVA-MATE E EUCALIPTO TRATADAS COM EBEtOH DE <i>O. martiana</i>	137
TABELA 23 - PORCENTAGEM DE G, IG, C, IC DAS PLÂNTULAS DE ALFACE.....	140
TABELA 24 - G, IVG, C, IC DAS RADÍCULAS E HIPOCÓTILOS DE PLÂNTULAS DE ALFACE.....	142
TABELA 24 - CLASSIFICAÇÃO DO PRODUTO ANALISADO	130
QUADRO I - ESCORES PARA A LEITURA DOS RESULTADOS OBTIDOS NO ENSAIO DA IRRITAÇÃO DA MUCOSA ORAL.....	63
QUADRO II - CLASSIFICAÇÃO DOS AGENTES TÓXICOS EM FUNÇÃO DA DL ₅₀	145

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

^{13}C	Isótopo do carbono com número de massa 13
AcOEt	Acetato de etila
ATCC	American Type Culture Collection
BDA	Batata-Dextrose-Ágar
BOD	Incubadora com Demanda Bioquímica de Oxigênio (B.O.D)
CC	Cromatografia em Coluna
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CDCl_3	Clorofórmio Deuterado
CG	Cromatografia Gasosa
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Resolução
δ	Deslocamento Químico
<i>d</i>	Dubleto
D.I.	Diâmetro Interno
Da	Dalton
<i>dd</i>	Duplo dubleto
DEPT	Espectro de RMN ^{13}C utilizando transferência de polarização
DL_{50}	Dose Letal Mediana
DRX	Difração de Raios-X
EB	Extrato Bruto
EBEtOH	Extrato Bruto Etanólico
EBS	Extrato Bruto Seco
EtOH	Etanol
FAcOEt	Fase Acetato de etila
FClor	Fase Clorofórmio
FD	Fase Diclorometano
FHex	Fase Hexano
FID	Detector de ionização de chama
FMeOH	Fase Metanólica
Hex	Hexano
IR	Índice de retenção
<i>J</i>	Constante de Acoplamento
^1H	Isótopo do hidrogênio com número de massa 1.
<i>m</i>	Multipleto
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
MBM	Museu Botânico Municipal
MHz	Megahertz

OMA 1	Isolado 1
OMA 10	Isolado 10
OMA 11	Isolado 11
OMA 12	Isolado 12
OMA 13	Isolado 13
OMA 2	Isolado 2
OMA 3	Isolado 3
OMA 4	Isolado 4
OMA 5	Isolado 5
OMA 6	Isolado 6
OMA 7	Isolado 7
OMA 8	Isolado 8
OMA 9	Isolado 9
OMS	Organização Mundial da Saúde
P.A.	Para análise
ppm	Parte por milhão
R _f	Fator de retenção
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13.
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio.
s.	Singleto
T	Tripleto
TMS	Tetrametilsilano
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UV	Ultravioleta
i.p.	Via intraperitoneal
v.o.	Via oral
v/v	Volume / Volume
λ _{MAX}	Comprimento de onda (nm) de absorção máxima

RESUMO

CUNICO, M. M. *Ottonia martiana* Miq., PIPERACEAE: um estudo fitoquímico com enfoque multidisciplinar. 2007. 176f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade federal do Paraná, Curitiba.

Um estudo fitoquímico com enfoque multidisciplinar foi realizado com *Ottonia martiana* Miq., arbusto da família Piperaceae, conhecida popularmente como "anestésia" devido à sua ação anestésica sobre a mucosa oral humana. Foram identificados 94 compostos desta espécie vegetal por meio de CG-EM, RMN de ^1H e ^{13}C , CLAE e DRX. Dos seus frutos isolou-se piperovatina. Das raízes foram isoladas as amidas piperovatina, piperlonguminina, isopiperlonguminina, pipericalosidina, assim como a amida (3*E*,5*E*)-*N*-isobutil-6-(4-metóxfenil)hexa-3,5-dienamida. Os ácidos *p*-anísico, piperonílico, metil-éster-14-metil-heptadecanóico e o sal nitrato de sódio também foram isolados. Dos caules isolou-se os esteróides estigmasterol e β -sitosterol, assim como os sais nitrato de sódio e sulfato de sódio. Óleos essenciais dos frutos, raízes e folhas foram caracterizados por CG-EM. Espatulenol (frutos e raízes) e cariofileno (folhas) encontravam-se majoritários. O bioensaio antimicrobiano revelou o potencial antibacteriano do extrato bruto etanólico dos órgãos totais (EBEtOH) frente às bactérias Gram-positivas testadas (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. mutans*, *S. mitis*, *S. pyogenes*, *S. salivarius*, *S. saprophyticus* e *E. faecium*). O teste de bioautografia permitiu identificar substâncias bioativas presentes no EBEtOH (piperovatina, piperlonguminina e isopiperlonguminina) e nos óleos essenciais (Rf 0,29: α -pineno, β -pineno e mirceno; Rf 0,34: α -copaeno, β -cariofileno e δ -cadineno). Os EBEtOH autoclavados (1000 ppm) e filtrados (1000 ppm) apresentaram atividade antifúngica *in vitro* (crescimento micelial) frente aos fitopatógenos *Cylindrocladium spathulatum* e *Botrytis cinerea*. Em contrapartida, no teste de germinação de esporos, a inibição foi evidenciada frente ao isolado de *C. spathulatum* (56,5%). Frente ao *B. cinerea*, uma tendência ao estímulo da germinação de esporos foi comprovada. No bioteste *in vivo* das folhas destacadas, um efeito inibidor das lesões foliares do EBEtOH (1000 ppm) frente aos isolados *C. spathulatum* (43,37%) e *B. cinerea* (28%) foi comprovado. Estes resultados sugerem que o EBEtOH apresenta potencial antifúngico sobre o desenvolvimento vegetativo dos fitopatógenos ensaiados. No bioensaio das mudas *in vivo*, o EBEtOH (1000 ppm) não foi ativo. O EBEtOH, fases hexano e clorofórmio e as amidas piperovatina e isopiperlonguminina apresentaram isoladamente efeito alelopático sobre o crescimento de plântulas de alface, o qual foi potencializado pela mistura contendo estas amidas. O EBEtOH não apresentou toxicidade no ensaio da irritação da mucosa oral e nos ensaios farmacológicos, os camundongos apresentaram intensa secreção salivar (em coelhos também), além de ereção da cauda (prova de Straub positiva). A DL₅₀ foi de 164,5 mg/kg com intervalo de confiança (IC) de 148 a 183 mg/kg por via oral e de 65 mg/kg com intervalo de confiança de 56 a 75 mg/kg por via intraperitoneal. A atividade anestésica local exibida pelo EBEtOH no modelo da anestesia intradérmica em cobaias não foi detectada no bioensaio dos reflexos palpebrais em córnea de coelhos. As FHex e FClor mostraram ser as fases bioativas do EBEtOH desta espécie vegetal.

Palavras-chave: *Ottonia martiana*, amida, antimicrobiano, alelopatia, anestésico local, óleo essencial.

ABSTRACT

CUNICO, M. M. *Ottonia martiana* Miq., PIPERACEAE: an phytochemical study with multidisciplinary focus. 2007. 176f. Thesis (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). – Setor de Ciências da Saúde, Universidade federal do Paraná, Curitiba.

A phytochemical study with multidisciplinary focus was performed with *Ottonia martiana* Miq. Piperaceae, common shrub in Atlantic Tropical Forest, known as “anestésia” due to its anesthetically action on human oral mucous. The antibacterial, antifungal, allelopathic and pharmacology potential were evaluated in this work. Ninety four compounds were identified by GC-MS, NRM ^1H and ^{13}C , HPLC and RXD. Piperovatine was isolated from fruits. Compounds as piperovatine, piperlonguminine, isopiperlonguminine, pipercollosidine and (3*E*,5*E*)-*N*-isobutyl-6-(4-methoxyphenyl)hexa-3,5-dienamide were isolated from roots, as well *p*-anisic acid, piperonilic acid, heptadecanoic acid 14 methyl methyl ester and sodium nitrate. Stigmasterol and β -sitosterol, sodium nitrate and sodium sulfate salts were isolated from stems. Spathulenol (fruits and roots) and β -caryophyllene (leaves) were the main compounds of the essential oils extracted from *O. martiana*. The antimicrobial assay revealed the antibacterial potential of the ethanolic extract of the whole plant (EBEtOH) against tested Gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *S. mutans*, *S. mitis*, *S. pyogenes*, *S. salivarius*, *S. saprophyticus*, and *E. faecium*). The bioautography assay allowed the detection of compounds with antibacterial activity as such as to identify bioactive components in the both EBEtOH (piperovatine, piperlonguminine and isopiperlonguminine) and essential oils (*R_f* 0,29: α -pinene, β -pinene and myrcene; *R_f* 0,34: α -copaene, β -caryophyllene and δ -cadinene). Autoclaved or filtrated EBEtOH extracts (1000 ppm) exhibited *in vitro* antifungal activity (mycelial growth) against the plant pathogens *Cylindrocladium spathulatum* and *Botrytis cinerea*. The results of the spores germination test against *C. spathulatum* showed antifungal activity of *O. martiana* (56,5 %), whereas in *B. cinerea*, a tendency of spores germination estimation was proved. The results of the antifungal assay on the formation of leaf spots caused by *C. spathulatum* and *B. cinerea*, in detached leaves of mate and eucalypt showed which the extract inhibited the development of foliar lesions in 43,37 % and 28 %, respectively, suggesting to be active on vegetative development of the tested fungi. However, in the *in vivo* assay on seedlings of *C. spathulatum* and *B. cinerea*, the EBEtOH (1000 ppm) was not active. The EBEtOH, hexane (FHex) or chloroform (Fclor) fractions, piperovatine or isopiperlonguminine exhibited an allelopathic effect on *Lactuca sativa* (lettuce) seedling growth, but seed germination was not affected. In the assay of irritation of oral mucous, EBEtOH have not showed toxicity. In the acute toxicity assay of the EBEtOH in mice, which was administered orally (p.o.) and/or intraperitoneally (i.p.) presented an median of lethal dose (LD₅₀) of 164.5 mg/kg (p.o.) and 65 mg/kg (i.p.), respectively. The parameters more visualized on mice were excessive salivation (in rabbits too) and erection of the tail (positive Straub reaction). The local anesthetic activity exhibited by EBEtOH in the infiltration anesthesia in guinea pig's wheals test was not detected in the rabbit conjunctival reflex test. FHex and FClor has shown to be bioactives fractions from *O. martiana*.

Palavras-chave: *Ottonia martiana*, amide, antimicrobial, allelopathy, local anesthetic, essential oils.

1 INTRODUÇÃO

Produtos naturais (PN) são substâncias químicas com notáveis propriedades biológicas, na sua grande maioria, descobertos empiricamente e obtidos de fontes animais ou vegetais, assim como de bactérias ou fungos, os quais são amplamente utilizados pela sociedade moderna como medicamentos, agroquímicos, bioinseticidas, fitocosméticos, flavorizantes, aromatizantes, corantes, aditivos alimentares, entre outros (VICKERY; VICKERY, 1981; PLETSCHE, 1998).

Dos diversos reinos da natureza, o reino vegetal é o que tem contribuído de forma mais expressiva para a obtenção de PN (RAMACHANDRA RAO; RAVISHANKAR, 2002; SANTOS et al., 2004a). Hoje, sabe-se que os PN vegetais podem apresentar uma ou mais substâncias bioativas, as quais apresentam sobre o organismo humano um efeito mais benéfico que as obtidas por síntese química (PINTO et al., 2002).

A cada dia, o mercado de PN vem crescendo de forma expressiva no mundo globalizado, levando à intensificação da pesquisa científica de plantas medicinais. Entretanto, a avaliação desse mercado promissor sob o prisma do desenvolvimento sustentável revelou a importância de se realizar pesquisas fitoquímicas com enfoque moderno, abordando áreas multidisciplinares, que visam não somente o conhecimento do perfil químico das plantas medicinais e a descoberta de novas substâncias, mas também a preservação e o conhecimento das propriedades biológicas das mesmas (MACIEL et al., 2002).

Nesta perspectiva, a busca por antimicrobianos naturais tem sido intensificada, pois é notória a resistência adquirida pelos microrganismos aos antibióticos convencionais utilizados na terapêutica humana. Segundo CAMA RAMACCIATO (2000), o uso de fitoterápicos antimicrobianos tem sido muito mais

difundido e pesquisado na Medicina do que nas outras áreas da saúde, podendo-se destacar pesquisas recentes aplicadas à dentística, as quais revelaram potencial antimicrobiano de extratos de plantas medicinais frente às bactérias da microbiota oral humana (SAEKI et al., 1993; BOWDEN, 1996; MEDEIROS PERIN, 2001; CORDEIRO et al., 2006; SOYAMA, 2007).

A busca por defensivos agrícolas naturais alternativos também tem sido intensificada, pois o uso indiscriminado e excessivo de agrotóxicos ao longo dos anos tem gerado uma crescente resistência de pragas, microrganismos fitopatogênicos e ervas daninhas aos produtos sintéticos, aumentando a dependência de insumos químicos por parte de produtores e impulsionando a indústria à descoberta e formulação de novos princípios ativos. Desta forma, um ciclo vicioso de alto custo econômico e ambiental é formado, tornando insustentável os sistemas de produção dos mesmos (COUTINHO, 1996).

Os recentes avanços na Química de Produtos Naturais (QPN) têm contribuído para um conhecimento mais acurado da composição química das plantas, e permitem revelar a bioatividade de muitas substâncias naturais, pela descoberta de efeitos antifúngicos e alelopáticos (interferência na germinação de sementes e no desenvolvimento de outras plantas), de grande interesse científico (STANGARLIN et al., 1999). Porém, muitos desses semioquímicos são utilizados na terapêutica humana, sem maiores investigações dos seus efeitos genotóxicos e mutagênicos (NUNES; ARAÚJO, 2003). Por isso, o enfoque multidisciplinar da fitoquímica moderna contempla, entre outros, a farmacologia e toxicologia, as quais são indispensáveis para a verificação da atividade, da aplicabilidade terapêutica e do grau de toxicidade dos extratos brutos ou de suas substâncias ativas isoladas e

identificadas, possibilitando desta forma a validação do uso terapêutico das plantas medicinais (MIGUEL; MIGUEL, 1999; PINTO et al, 2002).

No Brasil, propriedades biológicas de grande interesse medicinal têm sido reveladas em estudos com espécies vegetais pertencentes à família Piperaceae, as quais são adaptadas ao clima tropical (ANTUNES et al., 2001). Já no passado (século XIX), com a célebre frase "as plantas medicinais brasileiras não curam apenas, fazem milagres", VON MARTIUS definiu bem a capacidade das plantas medicinais brasileiras (MARTINS, 1995). O exposto associado ao fato do Brasil ser detentor da maior biodiversidade do Planeta, evidencia a vocação científica para a área mais antiga da Química: a Química dos Produtos Naturais (PINTO et al., 2002).

Dentre as diversas espécies de Piperaceae brasileiras, encontra-se a *Ottonia martiana* Miq., arbusto da Floresta Atlântica (YUNCKER, 1973), conhecida como "anestésia" pelos nativos do litoral paranaense (LOPES, 1989; CUNICO, 2001; CUNICO et al., 2003a). Devido à ação anestésica sobre a mucosa oral, suas raízes e partes aéreas são empregadas popularmente no tratamento de odontalgias, *in natura*, na forma de fragmentos ou alcoolaturas (LOPES, 1989; CUNICO et al., 2003b). Porém, apesar desta propriedade medicinal ser popularmente reconhecida, raras investigações científicas foram realizadas com esta espécie vegetal, sendo inexistentes as farmacológicas.

Diante do exposto e, reconhecendo que os PN constituem um dos pilares de sustentação da civilização moderna, pois garantem a qualidade de vida da espécie humana, visto serem menos danosos aos seres vivos e ao meio ambiente (PINTO et al., 2002), a realização de um estudo fitoquímico com enfoque multidisciplinar da *O. martiana* é justificada.

1.1 OBJETIVO GERAL

Realizar um estudo fitoquímico da *Ottonia martiana* Miq., Piperaceae, numa abordagem multidisciplinar, visando contribuir com a aquisição de maiores conhecimentos que viabilizem com segurança o aproveitamento desta planta medicinal pela sociedade.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e identificar constituintes químicos presentes no extrato bruto etanólico de *O. martiana*, por meio da otimização de técnicas já existentes.
- Identificar e quantificar constituintes químicos presentes nos óleos essenciais extraídos das folhas, caules e raízes desta espécie vegetal.
- Avaliar o potencial alelopático do extrato bruto, fases e substâncias isoladas.
- Avaliar o potencial antifúngico do extrato bruto, fases e/ou substâncias isoladas frente aos fitopatógenos *Cylindrocladium spathulatum* e *Botrytis cinerea*.
- Avaliar o potencial antibacteriano do extrato bruto, fases e/ou substâncias isoladas sobre bactérias da microbiota oral humana (*Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus salivarius*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella choleraesuis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*) e frente a microrganismos

relacionados a infecções nosocomiais (*Enterococcus faecium*, *Enterobacter aerogenes* e *Pseudomonas aeruginosa*).

- Realizar estudo farmacológico preliminar (Teste Hipocrático, Toxicidade Aguda – DL₅₀, Anestesia Tópica em Córnea de Coelhos e Teste de Anestesia Intradérmica) do extrato bruto e suas fases.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Para a realização deste trabalho, um levantamento bibliográfico foi realizado em diversas bases de dados dentre as quais destacam-se Chemical Abstract, Biological Abstract, Cab Abstract, Medline, International Pharmaceuticals Abstracts, Science Direct, abordando os temas Produtos naturais e Fitoquímica Multidisciplinar, além de aspectos gerais relacionados à família Piperaceae, gênero *Ottonia* e espécie *Ottonia martiana*.

2.1 PRODUTOS NATURAIS (PN)

Atualmente, face às necessidades do homem moderno, o emprego de PN tem sido intensificado no mundo globalizado.

Como os PN são resultantes da atividade metabólica dos seres vivos e apresentam propriedades notáveis, muitas de grande interesse medicinal, estudos foram intensificados e recentemente revelaram que muitos metabólitos secundários vegetais apresentam ação protetora em relação a estresses abióticos associados às mudanças de temperatura, conteúdos de água, níveis de luz, exposição à radiação ultravioleta (UV) e deficiência de nutrientes minerais (SILVA et al., 2002; DYER et al., 2003; LAGO et al., 2004). Estes estudos também revelaram que metabólitos podem apresentar funções contra a herbivoria, ataque de patógenos, competição entre plantas e atração de organismos benéficos como polinizadores, assim como de dispersores de sementes e microrganismos simbiotes (LAGO et al., 2004). Logo, a importância das interações que se produzem entre os seres vivos num dado ecossistema para a produção de substâncias bioativas foi comprovada.

2.1.1 Interações entre Seres Vivos

Segundo SIMAS et al. (2004), muitos PN são resultantes das interações e adaptações co-evolutivas complexas, que se produzem entre planta-animal, planta-planta e planta-microrganismo de um dado ecossistema.

Dentre os diversos tipos de interações existentes entre os seres vivos destacam-se as interações entre planta-animal, inseto-inseto, planta-planta, planta-microrganismo e animal-animal.

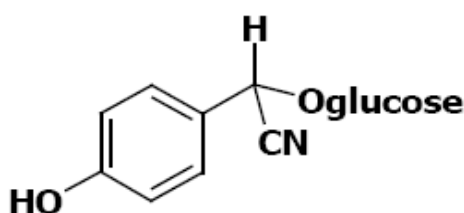
2.1.1.1 Interação planta-animal

Nesta interação ocorre a produção de substâncias tóxicas ou com sabores desagradáveis tais como os glicosídeos cianogênicos (se decompõem por hidrólise na boca de mamíferos herbívoros liberando ácido cianídrico) e a nicotina (alcalóide desagradável ao paladar, que pode servir de dissuasor aos herbívoros). De acordo com SCOTT et al. (2003), a produção de substâncias com ação “antifeedant” (fagorrepelente) levam os insetos à morte, pois estes deixam de se alimentar ou influenciam o desenvolvimento larvar dos mesmos. Também pode ocorrer neste tipo de interação, a produção de substâncias com propriedade de atrair insetos, a fim de que estes, no processo de polinização, transportem o pólen agarrado às suas patas e corpo (PINTO et al., 2002).

Como exemplo de interação planta-animal pode-se citar a durrina, um glicosídeo cianogênico que pode causar a morte do animal por intoxicação ciânica.

A estrutura química deste glicosídeo cianogênico encontra-se inserida na Figura 1, a seguir.

FIGURA 1 – ESTRUTURA QUÍMICA DO GLICOSÍDEO CIANOGENICO DURRINA.



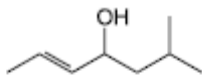
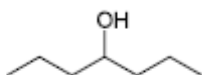
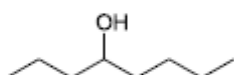
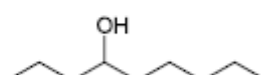
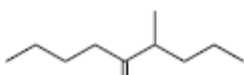
2.1.1.2 Interação inseto-inseto (feromônio)

Neste tipo de interação ocorre a produção de semioquímicos (sinais químicos), ou seja, substâncias por meio das quais a maioria dos insetos se comunica (MACIEL et al., 2002; MOREIRA et al., 2005).

Os semioquímicos também denominados feromônios [do grego *pherein* (= transferência) + *hormon* (=excitar)], são substâncias excretadas por organismos vivos e detectadas por outros indivíduos da mesma espécie, produzindo mudanças de comportamento específicas. Além disso, estas substâncias também atuam na comunicação intraespecífica. Os feromônios sexuais (provocam a atração entre macho e fêmea), de alarme (produzem estado de alerta pela aproximação de algum predador natural), trilha e oviposição (demarcam, respectivamente, o caminho até uma fonte de alimentos e o local onde os ovos foram depositados), assim como de agregação (inseto adulto macho, quando na planta hospedeira, libera feromônio de

agregação que atrai tanto insetos machos como fêmeas, para a fonte de alimento) (Tabela 1), destacam-se neste tipo de interação.

TABELA 1 – FEROMÔNIOS DE AGREGAÇÃO DE DIFERENTES ESPÉCIES DE *Rhynchophorus* APRESENTADOS ESTRUTURALMENTE EM SUA FORMA RACÊMICA.

Feromônio de Agregação	Planta	Praga
 6-Metil-2-hepten-4-ol (Rincoforol)	Palmeira das Américas	<i>R. palmarum</i>
 3-Metiloctan-4-ol (Foenicol)	Palmeira Africana	<i>R. phoenecis</i> <i>R. vulnearatus</i>
 5-Metiloctan-4-ol (Cruentol)	Palmeira Americana (E.E.U.U.)	<i>R. cruentatus</i>
 4-Metilnonan-5-ol (Ferruginol)	Palmeira Asiática	<i>R. ferrugineus</i> <i>R. vulneratus</i> <i>R. bilineatus</i> <i>R. palmarum</i>
 4-Metil-5-nonano	Palmeira Asiática	<i>R. vulneratus</i> <i>R. ferrugineus</i>

FONTE: NAVARRO et al. (2002).

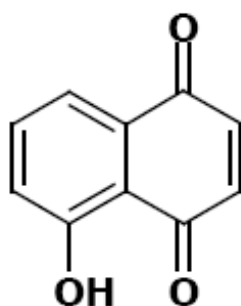
2.1.1.3 Interação planta-planta (alelopatia)

Nesta interação, as plantas têm a capacidade de interferir na germinação de sementes e no desenvolvimento de outras plantas por meio de semioquímicos, ou seja, substâncias que estas liberam na atmosfera, ou quase sempre no solo (GRASSI et al., 2005).

Os aleloquímicos constituem também uma forma de comunicação, pois permitem às plantas distinção entre os organismos que lhe são prejudiciais ou benéficos (RODRIGUES; LOPES, 2001).

Também cabe ressaltar que as substâncias químicas empregadas na comunicação entre espécies diferentes (interespecíficas) são denominadas de aleloquímicos, os quais são divididos em alomônios (favorecem a espécie emissora), cairomônios (favorecem a espécie receptora) e sinomônios (ambas são favorecidas). Segundo GRASSI et al. (2005), os alomônios geralmente são compostos utilizados para a defesa da espécie, enquanto os cairomônios são substâncias produzidas por uma presa e que são percebidas pelo predador. O alomônio juglona, glicosídeo exsudado pela casca da noqueira (tóxico quando hidrolisado à juglona livre, após ser arrastado pela chuva para o solo) é citado como exemplo de interação planta-planta, cuja estrutura encontra-se inserida na Figura 2.

FIGURA 2 – ESTRUTURA QUÍMICA DO ALOMÔNIO JUGLONA



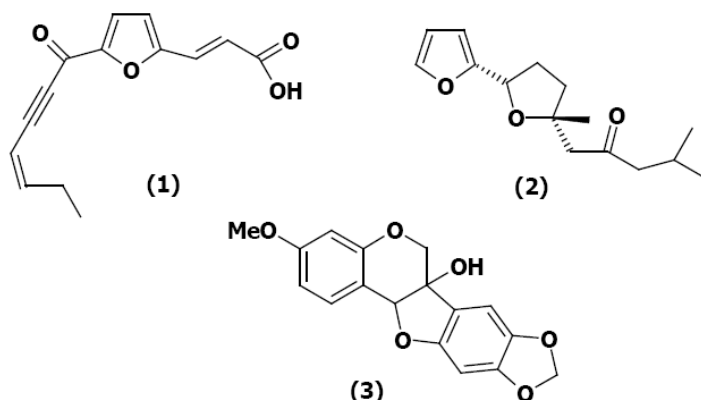
2.1.1.4 Interação planta-microrganismo (metabólitos de “stress”)

Esta interação ocorre quando uma planta é infectada por um microrganismo, levando à produção de novos metabólitos secundários denominados fitoalexinas

(PINTO et al., 2002; GRASSI et al., 2005). Em geral, estes metabólitos apresentam propriedades biológicas notáveis (antivirais, antibacterianas, antifúngicas, entre outros).

Algumas estruturas químicas de fitoalexinas encontram-se inseridas na Figura 3, a seguir:

FIGURA 3 - ESTRUTURAS QUÍMICAS DE FITOALEXINAS:
 (1) WYERONA ISOLADA DO FEIJOEIRO
 (2) IPOMEARONA ISOLADA DA BATATA DOCE
 (3) PISATINA ISOLADA DA ERVILHEIRA.



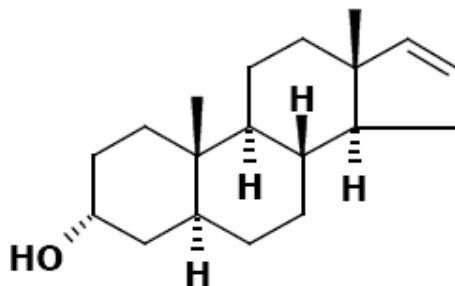
2.1.1.5 Interação animal-animal

Esta interação ocorre entre muitos animais que armazenam em glândulas metabólitos secundários para defesa, os quais são liberados quando atacados (batracotoxina, substância encontrada na pele dos sapos venenosos).

Também é importante ressaltar que, assim como certas esponjas e espécies de tubarões que produzem substâncias com propriedades antibacterianas ou antifúngicas, os mamíferos também produzem feromônios, dentre os quais destaca-se o esteróide 5- α -androst-16-en-3- α -ol (Figura 4), produzido por homens e

mulheres, porém em quantidades superiores pelas mulheres pouco antes da ovulação (GAGNON, 1997).

FIGURA 4 – ESTRUTURA MOLECULAR DO ESTERÓIDE
5- α -androst-16-en-3- α -ol.



Segundo GAGNON (1997), as mulheres são mais sensíveis ao odor dos feromônios. Ademais, há suspeitas de que o odor deste esteróide afeta a calendarização do ciclo menstrual e pelo sincronismo que se verifica em famílias com muitos elementos femininos e em instituições onde vivem muitas mulheres (residências universitárias, acampamentos, prisões, etc.). Segundo o autor supracitado, a sincronia inconsciente se faz pelo olfato, onde os feromônios liberados podem ser captados por terminações nervosas no nariz e acabam estimulando o grupo de mulheres ao mesmo tempo, como se elas sofressem um "reset" e passassem a começar o ciclo ao mesmo tempo. Porém, de acordo com CAMPOS (2003), este fenômeno não ocorre imediatamente, mas ao longo de meses de convívio intenso. Torna-se importante esclarecer que os semioquímicos (substâncias produzidas nas interações entre os seres vivos), podem ser classificados em feromônios e aleloquímicos. O esquema desta classificação encontra-se inserido na Figura 5, a seguir.

FIGURA 5 – ESQUEMA DA CLASSIFICAÇÃO DOS SEMIOQUÍMICOS

FONTE: <http://www.qmc.ufsc.br/qmcweb/artigos/colaboracoes/ecoquim/index.html>

2.1.2 Fitoquímica Multidisciplinar

Dentre os reinos da natureza, o reino vegetal é o que tem contribuído de forma mais significativa para a obtenção de PN de grande valor agregado (PHILLIPSON; ANDERSON, 1989; SANTOS et al., 2004a). Diante disso, o Brasil se destaca, pois apresenta uma rica flora cujos mistérios, começaram a ser desvendados quando o médico e botânico CARL FRIEDERICH VON MARTIUS, um dos iniciadores do estudo sistemático da flora brasileira, sugeriu que THEODORO PECKOLT estudasse a flora brasileira, em 1847 (PINTO et al., 2002). Como o trabalho fitoquímico deste pesquisador foi muito significativo, muitos hoje o consideram “Pai da Fitoquímica Clássica Brasileira”.

A fitoquímica clássica (Química dos Vegetais) é o ramo da química de produtos naturais (QPN) que se encarrega de estudar as substâncias bioativas vegetais (metabólitos vegetais), suas estruturas, distribuição na planta, modificações e os processos de transformação que se produzem durante o desenvolvimento,

coleta, armazenagem, assim como na preparação da droga vegetal e medicamento (MIGUEL; MIGUEL, 1999).

Apesar das atribuições inerentes à fitoquímica clássica e dos custos elevados e pouco frutíferos para se desenvolver medicamentos sintéticos ou semi-sintéticos, a flora brasileira ainda continua uma incógnita. Além disso, a pesquisa nacional de PN não tem recebido incentivos e como consequência, muitas substâncias exclusivas da fauna e flora brasileira têm sido patenteadas por empresas ou órgãos governamentais estrangeiros (MARTINS, 1995). Segundo HELENO (1999), estas empresas e órgãos governamentais estrangeiros consideram os PN como a maior fonte de inspiração para os atuais químicos, os quais devido à enorme variedade de estruturas, fazem com que a natureza pareça, na perspectiva humana, uma fonte inesgotável de novos produtos.

Os fatos supracitados, aliados à necessidade urgente por substâncias naturais que permitam o desenvolvimento sustentável do nosso Planeta, têm conduzido a fitoquímica brasileira a alterar o enfoque clássico para uma abordagem multidisciplinar, privilegiando desta forma estudos que contemplam, entre outros, a microbiologia, a farmacologia, a toxicologia, a ecologia química, além do desenvolvimento de novas metodologias analíticas. A busca de políticas que evitem a biopirataria e assegurem a propriedade intelectual brasileira, para atuar na fronteira do conhecimento, a exemplo do que ocorre nos países industrializados, também tem sido contemplada (MONTANARI; BOLZANI, 2001; MACIEL et al., 2002).

Como os PN e derivados foram e continuam sendo de importância crucial para determinados setores de uma sociedade moderna, os químicos brasileiros de PN tornaram-se atores importantes no palco do futuro mundial, já que o Brasil é

detentor da maior biodiversidade do Planeta, assim como de água, e de ser apontado, nos dias atuais, como futuro líder na produção de energia renovável (BRANDON et al., 2005; VIANNA, 2006).

Outrossim, cabe ressaltar que, dentre as diversas plantas medicinais brasileiras utilizadas na terapêutica popular, destacam-se espécies da família Piperaceae, que por apresentarem propriedades biológicas notáveis, motivaram a realização deste trabalho.

2.2 FAMÍLIA PIPERACEAE

A família Piperaceae pertence à super-ordem Nymphaei orae e ordem Piperales, tendo larga distribuição no mundo, com espécies desde o novo México até o sudeste da Argentina e reputação local estabelecida por suas propriedades medicinais (ANTUNES et al., 2001). Esta família pantropical é composta por 10 gêneros e por cerca de 2300 espécies (PARMAR, 1997).

No Brasil, a família Piperaceae é representada por 5 gêneros: *Piper*, *Peperomia*, *Pothomorphe*, *Ottonia* e *Sarcorrhachis* (PARMAR, 1997). De acordo com FIGUEIREDO e SAZIMA (2000), são encontradas nas florestas brasileiras 283 espécies de *Piper* L., 23 espécies de *Ottonia* Sprengel e 2 espécies de *Pothomorphe* Miquel (YUNCKER, 1973).

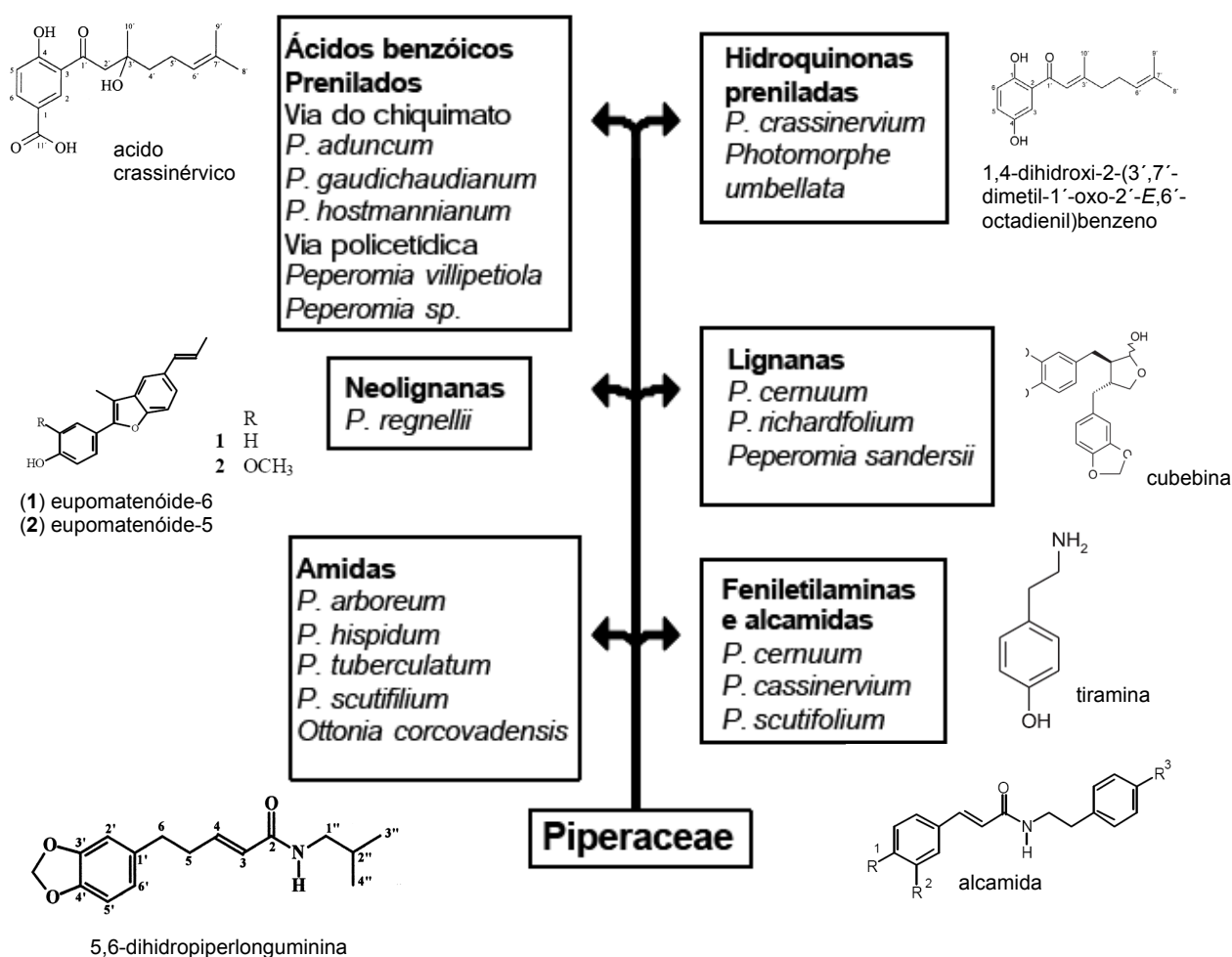
Como o papel dos metabólitos secundários no processo evolutivo de cada família vegetal do nosso Planeta é pouco conhecido, um estudo fitoquímico multidisciplinar com espécies de Piperaceae foi realizado no Brasil, dentro do programa BIOTA/FAPESP (KATO et al., 2004):

- a) Os bioensaios foram realizados contra fungos (bioautografia, *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*), moluscos (*Biomphalaria glabrata*), insetos (lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatilis*; broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis*) e parasitas (*Trypanosoma cruzi*). Os principais produtos biologicamente ativos foram identificados permitindo o agrupamento das espécies segundo a origem biossintética.
- b) Foram identificados ácidos benzóicos/cromenos prenilados (antifúngicos), hidroquinonas preniladas (antifúngicos), lignanas tetraidrofurânicas (atividade tripanossomicida), amidas de diversos esqueletos (antifúngicos, moluscicidas e inseticidas) em diversas espécies de Piperaceae.
- c) Os estudos de relação estrutura-atividade realizados com análogos naturais e sintéticos indicaram que as lignanas com relação *trans* entre os anéis aromáticos foram mais potentes do que o caso *cis*. Também foi observado que espécies acumuladoras de lignanas/neolignanas são predadas preferencialmente por Lepdopteras (*Heraclydes brasiliensis*) enquanto aquelas que produzem ácidos benzóicos prenilados são predadas por Coleópteras (*Naupactus bipes*).
- d) Estudos de ecologia química demonstraram relações de especificidade química de insetos pertencentes a diversas ordens (Coleoptera, Lepidoptera e Hemiptera) com espécies de Piperaceae, assim como de

biotransformações (estudos das reações que ocorreram nos insetos durante o processo de digestão de folhas de espécies de Piperaceae)

O estudo multidisciplinar anteriormente citado possibilitou caracterizar diversos grupos de Piperaceae contendo amidas, ácidos benzóicos prenilados, cromenos prenilados (oriundos das vias do chiquimato e policetídica), lignanas e neolignanas, os quais podem ser visualizados no esquema inserido na Figura 6, a seguir.

FIGURA 6 - PRINCIPAIS CLASSES DE PRODUTOS NATURAIS ISOLADOS DE PIPERACEAE E SUAS ESTRUTURAS QUÍMICAS BÁSICAS.



FONTE: KATO et al. (2004)

2.2.1 Gênero *Ottonia*

O gênero *Ottonia* é um dos gêneros pertencentes à família Piperaceae, família esta pantropical com espécies distribuídas nas florestas brasileiras, produtoras de substâncias de grande interesse medicinal (SINGH et al. 1996; FIGUEIREDO; SAZIMA, 2000; ANTUNES et al., 2001).

Estudo realizado por YUNCKER (1973) com 23 espécies que compõem o gênero *Ottonia* forneceu a chave analítica para a identificação das mesmas. Segundo este autor, o gênero *Ottonia* representa um desenvolvimento evolucionário recente de *Piper*, e as diferenças entre as espécies pertencentes a este gênero não são notáveis.

De acordo com ANTUNES et al. (2001), a maioria das espécies descritas para o gênero *Ottonia* (21) é nativa do Brasil.

2.2.1.1 Aspectos etnobotânicos de espécies do gênero *Ottonia*

Várias espécies de *Ottonia* são utilizadas pela população com finalidades terapêuticas, para os mais diversos tratamentos.

Segundo LOPES (1989):

- a) A *O. anisum* Sprengel, comum na região central do Brasil, é conhecida popularmente como falso jaborandi. Suas raízes são diuréticas, diaforéticas, sialogogas e afrodisíacas. A sua tintura é empregada como

estimulante em fricções nas paralisias e reumatismos, e no tratamento de odontalgias.

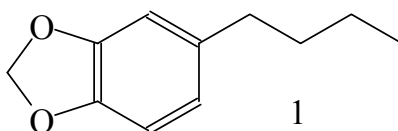
- b) A espécie *O. carpunga* Miq., popularmente conhecida como alfavaca carpunha, é natural da Bahia. Sua raiz é excitante e aromática, sendo também utilizada contra picadas de cobras.
- c) *O. eucalyptophyllum* Kunth, natural do Rio de Janeiro e São Paulo, é popularmente conhecida como nhandu-mirim. Sua raiz é considerada um diurético energético e antiblenorrágico.
- d) A *O. propinqua* Kunth (*Ottonia corcovadensis*), conhecida popularmente como xery-caá, jaguarandi e jaborandi, é natural do Rio de Janeiro, Minas Gerais, São Paulo, Paraná e Santa Catarina. Sua raiz, que possui aroma ativo, provoca anestesia e salivação. Esta espécie de *Ottonia* era utilizada pelos selvagens como antídoto de intoxicação por cogumelos.
- e) *O. vahlii* Kunth, também conhecida como *Piper ovatum* Vahl, é em Trinidad (América Central) utilizada como medicamento contra picadas de cobra e para cura de hidrofobia em animais, por ser um depressor nervoso, veneno cardíaco e anestésico local. É natural da Índia Ocidental.
- f) Outra espécie deste gênero, a *O. warakabacoura* Miq., planta conhecida como nhambi e natural do Amazonas e Guianas, é recomendada para o tratamento de moléstias do aparelho urinário, como substância estimulante e sialogoga.

De acordo com ANTUNES et al. (2001), plantas do gênero *Ottonia* são empregadas na medicina popular como anestésicos locais e alucinógenos.

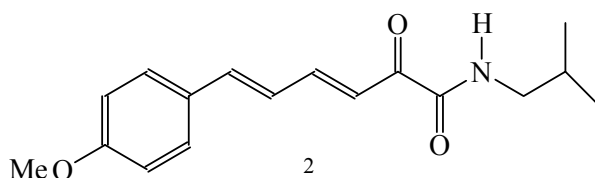
É importante salientar que dentre as várias espécies de *Ottonia* conhecidas pela população brasileira, a *O. propinqua* (*O. corcovadensis*) (KUZE RATES; CHAVES; VON POSER, 1997), *O. frutescens* (MAKAPUGAY et al., 1983) e *O. anisum* (GIESBRECHT et al., 1981) são utilizadas no tratamento de odontalgias. A espécie *O. corcovadensis*, uma das principais espécies vegetais da terapêutica popular do Estado do Acre e conhecida como “João brandinho” pelos nativos das regiões norte e nordeste do Brasil, é empregada no tratamento de gripe e tosse (chá das folhas), assim como do reumatismo (compressa com as folhas) (FACUNDO et al., 2004).

2.2.1.2 Aspectos fitoquímicos de espécies do gênero *Ottonia*

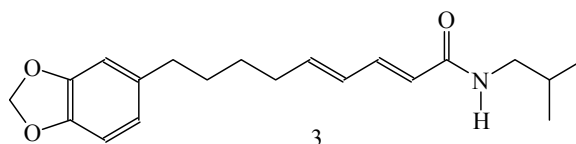
DUSTAN e GARNETT (1895) isolaram da *O. vahlii* (usada como planta medicinal em Trinidad por provocar formigamento na língua e lábios), um óleo essencial com características compatíveis a sesquiterpenos, e um componente não volátil denominado de piperovatina. Os constituintes químicos deste óleo essencial foram reinvestigados por PINDER e PRICE (1967), os quais elucidaram a estrutura molecular da substância ($C_{11}H_{14}O_2$) denominada 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno (1).



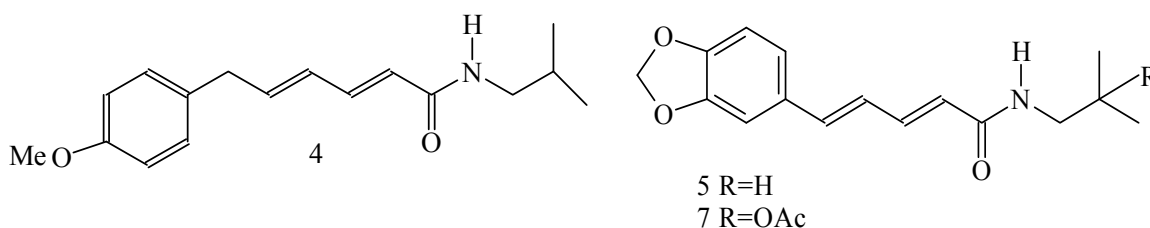
Também de *O. vahlii*, estudada por PINDER e PRICE (1967), HÄNSEL et al. (1980), foi isolado a piperovatina e uma nova isobutilamida ($C_{17}H_{21}NO_3$): ácido *p*-metoxi-cinamal-pirúvico (**2**).

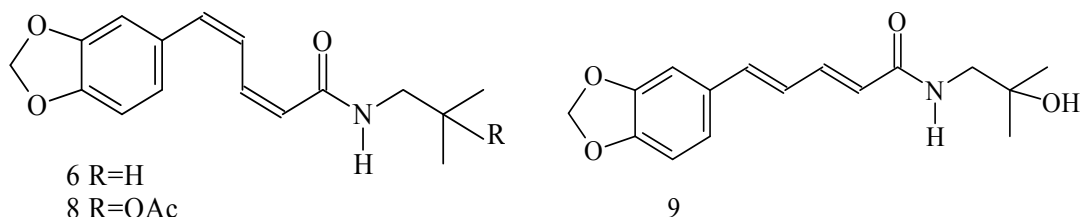


A piperovatina, 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno e a amida até então desconhecida (2*E*, 4*E*) *N*-isobutil-9-piperonil-nona-2,4-dienamida, com fórmula molecular $C_{20}H_{26}NO_3$ (**3**), foram isoladas das raízes e caules de *O. anisum* por GIESBRECHT et al. (1981).



COSTA e MORS (1981) isolaram 5 amidas das raízes de *O. corcovadensis* (*O. propinqua*), sendo 2 conhecidas: a piperovatina (**4**) e piperlonguminina (**5**), e 3 novas, denominadas de isopiperlonguminina (**6**), corcovadina (**7**) e isocorcovadina (**8**). Da hidrólise alcalina da corcovadina obteve-se ácido pipérico e a amida *N*-(2-hidroxi-isobutil) pipérico (**9**).





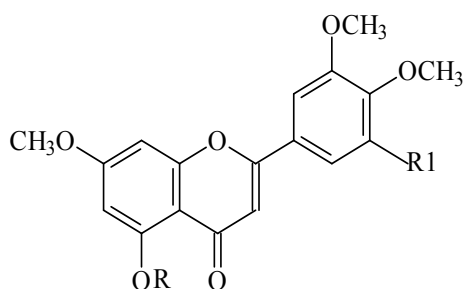
Piperovatina também foi isolada das raízes e caules de *O. frutescens* por MAKAPUGAY et al. (1983).

Do óleo essencial das folhas de *O. anisum* (coletadas em Teresópolis, RJ - BR), MOREIRA et al. (1997) isolaram e identificaram a substância 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno (95%). Análise cromatográfica (CG-EM) deste óleo comprovou a presença de monoterpenos e sesquiterpenos, identificados como α -pineno, β -pineno, mirceno, limoneno, δ -cadineno, germacreno D e γ -muroleno.

A composição do óleo volátil das folhas de *O. anisum* (coletadas nas proximidades de Parati, RJ - BR) foi analisada por SANTOS et al. (2001), onde *E*-nerolidol foi encontrado em alta concentração (11,28%). A substância 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno, majoritária na espécie vegetal coletada em Teresópolis (MOREIRA et al., 1997), não foi detectada na amostra analisada por SANTOS et al. (2001).

ANTUNES et al. (2001) caracterizaram a piperovatina extraída da *O. propinqua* por espectroscopia, e confirmaram a sua estrutura molecular.

FACUNDO et al. (2004) isolaram do extrato etanólico de folhas da *O. corcovadensis* (*O. propinqua*) 3 flavonóides (3',4',5,5',7-pentametoxiflavona (**10**); 3',4',5,7-tetrametoxiflavona (**11**) e 5-diidroxí- 3',4',5',7-tetrametoxiflavona (**12**) e ácido caféico.

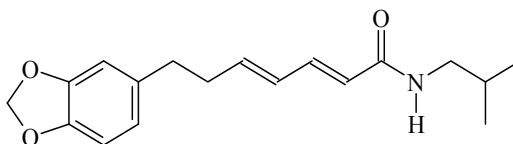


10 R=Me, R1=OMe

11 R=Me, R1=H

12 R=H, R1=OMe

FACUNDO et al. (2004) detectaram no óleo essencial das folhas de *O. corcovadensis* 16 terpenóides (β -pineno, α -felandreno, *p*-cimeno, limoneno, α -cubebeno, α -copaeno, β -elemeno, *trans*-cariofileno, (*Z*)-farneseno, β -bisabolenos, aloaromadendreno, biciclogermacreno, *epi*-biciclosesquifelandreno, γ -cadineno, δ -cadineno, germacreno B). Também isolaram do extrato etanólico das raízes desta espécie vegetal as amidas piperovatina e chingchengenamida (**13**).



13

2.2.1.3 Atividades biológicas de extratos e substâncias isoladas de espécies do gênero *Ottonia*

Embora estudos fitoquímicos tenham sido realizados com algumas espécies de *Ottonia*, pouco se conhece sobre as atividades biológicas dos extratos e da maioria das substâncias isoladas deste gênero.

KUZE RATES et al. (1997) investigaram o efeito anestésico local (*in vivo*) e a toxicidade do extrato etanólico das raízes de *O. propinqua*, cujos resultados comprovaram a existência de atividade anestésica, sinais de irritação local e DL₅₀ em camundongos de 33 mg/kg, i.p.

Dentre os poucos estudos biológicos realizados com substâncias isoladas de espécies deste gênero destaca-se a investigação realizada com a piperovatina isolada da *O. frutescens*, cujos resultados mostraram um leve efeito de salivação e uma dormência e sensação de queimadura na língua, que persistiu por aproximadamente 35 minutos após contato com esta substância. Segundo MAKAPUGAY et al. (1983), o interesse pela atividade anestésica local da piperovatina é antigo, mas a curta duração de seus efeitos, juntamente com a tendência em induzir excesso de salivação, tem impossibilitado a sua aplicação com sucesso em pequenas cirurgias odontológicas.

Em estudo realizado com a piperovatina isolada da *Piper piscatorium*, espécie vegetal pertencente à mesma família do gênero *Ottonia* (Piperaceae), um potencial piscicida foi evidenciado (MCFERREN; RODRIGUEZ, 1998). Com a piperlonguminina isolada da *Piper auritum*, uma atividade inseticida foi comprovada (SÁEZ et al., 1998).

Na avaliação neurofarmacológica *in vitro* da piperovatina isolada de *Piper piscatorium*, a habilidade para induzir alterações da concentração de cálcio intracelular de células nervosas foi verificada. Os resultados obtidos sugeriram que a piperovatina age por ativação dos canais de sódio voltagem-dependente (MCFERREN et al., 2002).

2.2.2 Espécie *O. martiana*

A *O. martiana* é conhecida pela população brasileira como “anestésia” (LOPES, 1989; CUNICO, 2001), “jaborandi, taburutá e jaguarandi” (GUIMARÃES; ICHASO; COSTA, 1978).

É encontrada florescendo nos meses de março, outubro, novembro e dezembro, sendo um arbusto de apenas 1 a 2 metros de altura, característico da mata pluvial da encosta atlântica do estado de Santa Catarina, apresentando vasta e muita expressiva dispersão por quase toda a zona da Mata Atlântica, penetrando no Rio Grande do Sul, através da “Porta de Torres”. Esta espécie é ciófito e seletiva higrófito e ocorre principalmente nas planícies aluviais, nos inícios das encostas, bem como em solos de aclive pouco acentuado.

Segundo YUNCKER (1973), a *O. martiana* está distribuída nas regiões sul e sudoeste brasileira. No Paraná pode ser encontrada em Antonina, Guaratuba e Município de Paranaguá, assim como na Serra da Preta, Pinhais, Caiobá, Morro do Caieba, Jaguariaíva, Adrianópolis e Paranaíba (GUIMARÃES; ICHASO; COSTA, 1978).

2.2.2.1 Aspectos botânicos e etnobotânicos da *O. martiana*

A *O. martiana* é utilizada pela população no tratamento de odontalgias na forma de alcoolatura (bochechos), ou pela mastigação de fragmentos da planta, promovendo alívio imediato da sensação de dor, motivo pelo qual é conhecida por “anestésia” (LOPES, 1989; CUNICO, 2001; CUNICO et al., 2003a).

A classificação taxonômica desta espécie vegetal encontra-se disponível na Tabela 2.

TABELA 2 - ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO DA *Ottonia martiana*

	Segundo ENGLER (1964)	Segundo CRONQUIST (1981)
Divisão:	Angiospermae	Magnoliophyta
Classe:	Dicotyledoneae	Magnoliopsida
Subclasse:	Archichlamydeae	Magnoliidae
Ordem:	Piperales	Piperales
Família:	Piperaceae	Piperaceae (Peperomiaceae)
Gênero	<i>Ottonia</i>	<i>Ottonia</i>
Espécie	<i>Ottonia martiana</i>	<i>Ottonia martiana</i>

De acordo com GUIMARÃES, ICHASO e COSTA (1978):

- a) *O. martiana* é um arbusto ramoso, acima de 2 m de altura, com ramos estriados, glabros e entrenós distando em 4-9 cm.
- b) Suas folhas são curto-pecioladas, com 1-1,5 cm de comprimento.
- c) A lâmina das folhas é elíptico-ovada, com 10-16 cm de comprimento e 5-9 cm de largura, assimétrica, base arredondada ou subarredondada, levemente assimétricocordada, acuminada no ápice, glabrescente ou pubescente na nervura média dorsal e glabra na ventral, com nervuras impressas nesta face.
- d) As nervuras secundárias, em número de 10, são alternas e ascendentes em relação à principal, as nervuras terciárias são axiais e laterais e

ocorre anastomose de nervuras de ordem inferior paralelamente ao bordo.

- e) As espigas apresentam 8-11 cm de comprimento, com pedúnculo piloso, e variam de 5-10 mm em diâmetro na floração e 12-15 mm, na frutificação.
- f) A raque é sulcada, de pubérula a glabrescente. As bractéolas são sacado-galeadas, curto-pediceladas.
- g) As flores apresentam pedicelos piloso-papilosos ou glabrescentes, com 2 mm de comprimento, ultrapassando o comprimento do ovário.
- h) Os estames têm filetes curtos, e estão inseridos na base do ovário. O ovário é papiloso, ovado-tetragonal.
- i) Os estigmas são em número de quatro, robustos.
- j) As drupas são oblongo-ovóides, tetragonais, com 3-4 mm de comprimento, atenuadas no ápice.

Alguns aspectos morfológicos desta espécie vegetal podem ser visualizados na Figura 7, a seguir.

FIGURA 7 - ALGUNS ASPECTOS MORFOLÓGICOS DA *Ottonia martiana*.



FONTE: AUTORA (2004)

FIGUEIREDO e SAZIMA (2000) realizaram uma investigação sobre a polinização da *O. martiana* em uma floresta do sudoeste brasileiro. Segundo os autores, a floração ocorreu durante o ano continuamente, com um pico durante os meses em que os ventos são mais intensos. Os resultados deste estudo revelaram que as inflorescências desta espécie apresentam $118,80 \pm 2,59$ flores miúdas amarelas (sulphur yellow), com pequeno odor e sem néctar, as quais são visitadas por insetos (Figura 8). Neste estudo, a polinização desta espécie se deu principalmente pela ação do vento.

FIGURA 8 – INFLORESCÊNCIA DA *Ottonia martiana* EXIBINDO SUAS FLORES MIÚDAS.



FONTE: FIGUEIREDO e SAZIMA (2000).

2.2.2.2. Aspectos fitoquímicos da *Ottonia martiana*

LOPES (1989) e CUNICO (2001), realizaram estudos fitoquímicos com esta espécie vegetal, os quais resultaram no isolamento e identificação de substâncias já conhecidas, as quais foram previamente isoladas de outras espécies de *Ottonia* (DUSTAN; GARNETT, 1895; COSTA; MORS, 1981; FACUNDO et al., 2004).

As isobutilamidas piperovatina e piperlonguminina, e o sal nitrato de potássio, foram isolados de extratos de *O. martiana* (partes aéreas) por LOPES (1989).

As substâncias isopiperlonguminina e piperovatina foram isoladas das raízes de *O. martiana* (CUNICO, 2001). Além disso, CUNICO et al. (2003b) detectaram nos

frutos desta espécie vegetal a presença de dois esteróides isômeros dos esteróides estigmasterol e β -sitosterol.

2.2.2.3. Atividades biológicas da *O. martiana*

Avaliações preliminares da atividade antibacteriana dos extratos brutos etanólicos (EBEtOH) de *O. martiana* (caules e raízes) foram realizados frente a culturas puras de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) e *Escherichia coli* (ATCC 8739), utilizando-se o método de difusão em ágar. Neste estudo verificou-se inibição do crescimento de *S. aureus*. Para as outras cepas testadas, halos de inibição não foram observados (CUNICO, 2001).

Também CUNICO et al. (2004) realizaram uma investigação preliminar do potencial antifúngico de extratos desta espécie contra isolados dos fitopatógenos *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum acutatum* e *Rhizoctonia* sp. Os resultados obtidos nesta avaliação mostraram que os extratos (etanólicos e aquosos) utilizados nos ensaios inibiram o crescimento micelial de cada patógeno analisado.

Até o presente momento não há registros de estudos farmacológicos com esta espécie vegetal.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL, INSTRUMENTAÇÃO E MÉTODOS GERAIS

Os reagentes e solventes empregados nos procedimentos fitoquímicos e analíticos apresentavam grau analítico (P.A.) ou cromatográfico (CLAE), quando necessário.

Para a remoção dos solventes utilizados nos processos de extração, particionamento e isolamento, empregou-se um evaporador rotatório Büchi, operando à pressão de 30 mmHg e temperatura de 40 °C.

As cromatografias em camada delgada (CCD) foram realizadas em cromatoplasmas de Sílica gel 60 (TLC aluminium – MERCK). As detecções dos compostos foram realizadas por irradiação com lâmpada de ultravioleta (UV: 366 e 254 nm) e posterior revelação com reagente de Dragendorff ou vanilina sulfúrica seguida de aquecimento (10 min).

Nas cromatografias em coluna (CC), utilizou-se como fase estacionária a Sílica gel 60 (70-230 mesh - MERCK).

A análise qualitativa foi realizada por meio de cromatografia gasosa capilar acoplada à espectrometria de massas (CG-EM, VARIAN com íon trap, modelo 3800/SATURN 2000), nas seguintes condições:

A: coluna capilar Chrompack de sílica fundida CP-SIL 5 CB (60 m x 0,25 mm D.I. x 1,00 µm), He como gás de arraste, split 1:100, velocidade linear de 1,6 mL min⁻¹, intensidade de ionização de 70 eV por impacto de elétrons, modulação axial de 6 V, temperaturas de 300°C no injetor, 300°C no detector e na coluna, a temperatura programada de 100 - 300°C numa taxa

de aquecimento de $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$, permanecendo em 300°C por 10 minutos, volume de injeção de 0,2 - 0,5 μL .

B: coluna capilar Chrompack de sílica fundida CP-SIL 5 CB (60 m x 0,25 mm D.I. x 1,00 μm), He como gás de arraste, split 1:100, velocidade linear de $1,6 \text{ mL min}^{-1}$, intensidade de ionização de 70 eV por impacto de elétrons, modulação axial de 6 V, temperaturas de 300°C no injetor, 300°C no detector e na coluna, a temperatura programada de 100 - 300°C numa taxa de aquecimento de $20^{\circ}\text{C min}^{-1}$, permanecendo em 300°C por 10 minutos. Volume de injeção de 0,2 - 0,5 μL .

C: coluna capilar Chrompack de sílica fundida CP-SIL 5 CB (30 m x 0,25 mm D.I. x 1,00 μm), He como gás de arraste, split 1:50, velocidade linear de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, intensidade de ionização de 70 eV por impacto de elétrons, modulação axial de 6 V, temperaturas de 300°C no injetor, 300°C no detector e na coluna, a temperatura programada de 200 - 300°C numa taxa de aquecimento de $20^{\circ}\text{C min}^{-1}$, permanecendo em 300°C por 10 minutos. Volume de injeção de 0,2 - 0,5 μL .

D: coluna capilar CP-SIL PONA CB (100 m x 0,25 mm D.I. x 0,25 μm de filme), He como gás de arraste, split 1:200, velocidade linear de $1,6 \text{ mL min}^{-1}$, intensidade de ionização de 70 eV por impacto de elétrons, modulação axial de 6 V, temperaturas de 200°C no injetor, 200°C no detector e na coluna, a temperatura programada de 140°C durante 10 minutos, variação de $5^{\circ}\text{C min}^{-1}$ entre 140- 230°C e 230°C por 25 minutos. Volume de injeção de 0,2 - 0,5 μL .

Análise quantitativa foi realizada por meio de cromatografia gasosa (CG), em um cromatógrafo VARIAN, modelo CP 3800, com detector de ionização de chama (DIC), nas mesmas condições empregadas na análise qualitativa, por meio de integração eletrônica das áreas dos picos (Método de Normalização de Área).

Os índices de retenção (IR) foram calculados para os constituintes voláteis de acordo com a equação de Van den Dool e Kratz (VAN DEN DOOL & KRATZ, 1963), após co-injeção de uma mistura de *n*-alcanos (série homóloga C₉ a C₂₀) sob as mesmas condições de análise empregadas na CG-EM.

As análises por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram realizadas em aparelho Merck-Hitachi, composto de bomba L7100, degaseificador de solventes L7812, válvula de injeção Rheodyne 7725i, detector DAD L7450, interface L7000 conectada ao sistema operacional Windows NT, coluna XTerra® RP₁₈ 5 µm (4,6 x 250 mm, D.I.), com eluição isocrática {45% de Fase A [lauril sulfato de sódio (1 mg mL⁻¹) em solução contendo 20% de fase Diluente [(FD): H₂SO₄ 0,05 M à 1% de H₃PO₄] e 80% de água deionizada à 1% de acetonitrila (ACN)]; 24 % de Fase B [lauril sulfato de sódio (1 mg mL⁻¹) em solução contendo 95% de MeOH e 5% de FD]; 31% de Fase C [lauril sulfato de sódio (1 mg mL⁻¹) em solução contendo ACN:FD (90:10 v/v)]; gradiente de fluxo [0 - 8 min: 0,8 mL min⁻¹; 8 - 20 min: 1,2 mL min⁻¹; 20 - 23 min: 1,5 mL min⁻¹].

A cromatografia preparativa por CLAE foi realizada em aparelho Merck-Hitachi composto de bomba L7100, degaseificador de solventes L7812, válvula de injeção Rheodyne 7725i, detector DAD L7450, interface L7000 conectada ao sistema operacional Windows NT, coluna preparativa XTerra® Prep RP₁₈ 10µm (7,8 X 300 mm, D.I.) com eluição isocrática [30% de Fase A (HCl 0,01M), 70% de Fase B (MeOH)], em 35 minutos, vazão de 2,0 mL min⁻¹.

A hidrodestilação foi realizada num aparelho do tipo Clevenger modificado.

Os espectros de ressonância magnética nuclear de carbono-13 (RMN ^{13}C), hidrogênio (RMN ^1H) e DEPT ^{13}C -135 foram registrados em espectrômetros BRUCKER AVANCE 400, operando a 9,4 Tesla e em temperatura ambiente ou em um espectrômetro BRUCKER AVANCE 200, operando a 4,7 Tesla, em temperatura ambiente. Como solvente utilizou-se clorofórmio deuterado (CDCl_3). O tetrametilsilano (TMS) foi empregado como referência interna. Os deslocamentos químicos (δ) foram indicados em ppm e as constantes de acoplamentos (J) em Hertz (Hz).

Os difratogramas de raios-X foram obtidos em um equipamento Shimadzu XRD-6000, utilizando radiação $\text{Cu-K}\alpha$ ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$), voltagem de 40 kV e corrente de 40 mA, sendo a velocidade de varredura de 2° min^{-1} . As análises foram realizadas à temperatura ambiente.

3.2 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

Raízes e partes aéreas (caules, folhas e frutos) de *O. martiana* foram coletadas em fevereiro de 2002 e 2003, em Coroados, Município de Guaratuba (encosta da Floresta Atlântica - Serra do Mar), estado do Paraná, a uma altitude de 20 metros em relação ao nível do mar.

A identificação da espécie botânica foi realizada pelo botânico Dr. Gerdt Hatschbach do Museu Botânico Municipal (MBM) da Prefeitura de Curitiba, Paraná, e um exemplar desta espécie (exsicata), encontra-se depositado no herbário deste museu, devidamente catalogado e registrado sob o nº 259.057.

3.3 EXTRAÇÃO, PARTICIONAMENTO E ISOLAMENTO DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS

O material coletado (raízes e partes aéreas) foi submetido à dessecação em estufa com tiragem de ar úmido, à temperatura de 40°C, durante 48 horas para estabilização (~10% de umidade), e em seguida foi conservado ao abrigo de luz e umidade até ser submetido à extração.

3.3.1 Obtenção e Particionamento do Extrato Bruto Etanólico dos Órgãos Totais (Raízes, caules, folhas e frutos - coleta de 2002)

Raízes e partes aéreas (caules, folhas e frutos) de *O. martiana* secas e pulverizadas (700 g) foram submetidas à tripla maceração a frio (3 x 7 dias), em etanol (95%), totalizando 21 dias.

Após filtração, concentração em evaporador rotatório sob pressão reduzida e 40°C, armazenamento em frasco âmbar, conservação em freezer por 24 horas para precipitação de pigmentos, e filtração a vácuo, foi obtido 180 mL de Extrato Bruto Etanólico (EBEtOH) dos órgãos totais (raízes, caules, folhas e frutos).

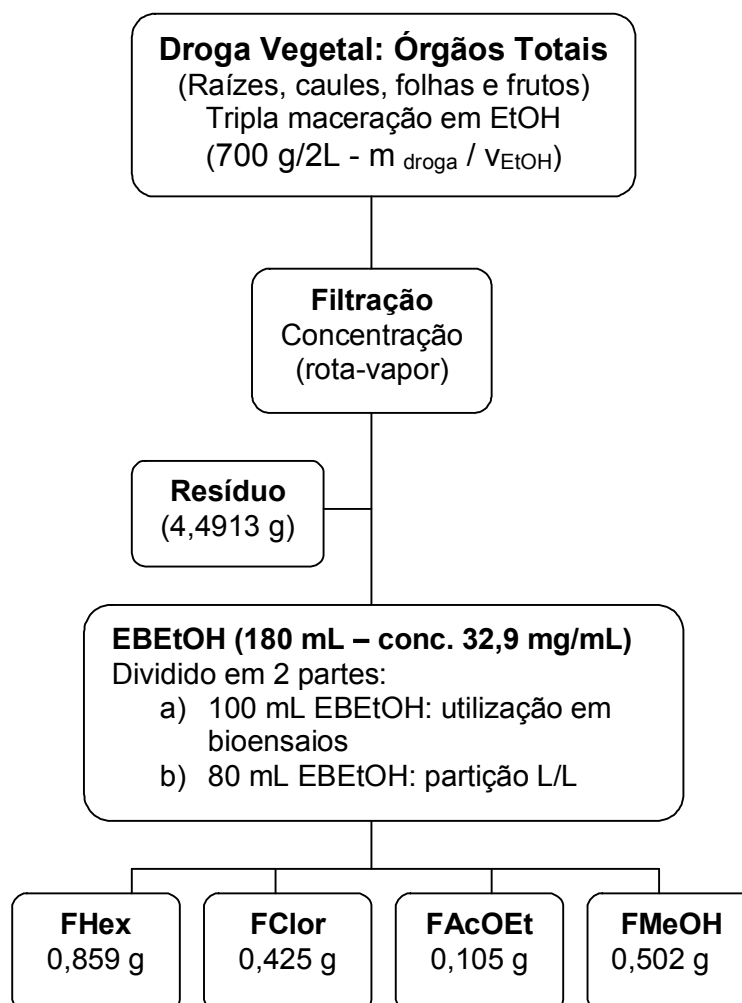
Uma parte deste EBEtOH dos órgãos totais (100 mL) foi reservada para utilização em bioensaios, e a outra (80 mL), para particionamento.

O particionamento do EBEtOH dos órgãos totais foi realizado pelo processo de partição líquido-líquido (L/L), a frio, utilizando-se funil de separação. A partição foi realizada inicialmente com hexano (250 mL). A fase solúvel em hexano foi reservada e o resíduo etanólico novamente particionado com 250 mL de clorofórmio. Dando-se continuidade a este particionamento, utilizou-se o mesmo procedimento para os solventes acetato de etila e metanol.

As fases obtidas do EB_{EtOH} dos órgãos totais foram denominadas de fase hexano (FHex), fase clorofórmio (FClor), fase acetato de etila (F_{AcOEt}), fase metanólica (F_{MeOH}). Após concentração em evaporador rotatório (40°C) à quase completa secura (redução à 1/5 do volume inicial), as fases FHex (0,859 g), F_{Clor} (0,425 g), F_{AcOEt} (0,105 g), F_{MeOH} (0,502 g) foram armazenadas sob refrigeração e ausência de luz para posterior utilização em bioensaios.

A obtenção do extrato e de suas fases pode ser melhor visualizada a partir do fluxograma (Figura 9), a seguir.

FIGURA 9 – FLUXOGRAMA DA OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO DOS ÓRGÃOS TOTAIS (RAÍZES, CAULES, FOLHAS E FRUTOS) DE *Ottonia martiana* E DE SUAS FASES.



3.3.2 Obtenção do EBEtOH dos Frutos de *O. martiana* (coleta de 2002), Particionamento e Isolamento de Substâncias

Frutos secos de *O. martiana* (24,5 g) foram moídos e submetidos à extração em Soxhlet modificado (Figura 10), durante 5 horas, em etanol a 95% (a quente), conforme descrito por CARVALHO (2001).

Após concentração em evaporador rotatório sob pressão reduzida (40°C), armazenamento em frasco âmbar, conservação em freezer (24 h) para precipitação de pigmentos e filtração a vácuo, foram obtidos 50 mL de EBEtOH dos frutos desta espécie vegetal.

FIGURA 10 – SOXHLET MODIFICADO



FONTE: CARVALHO (2001)

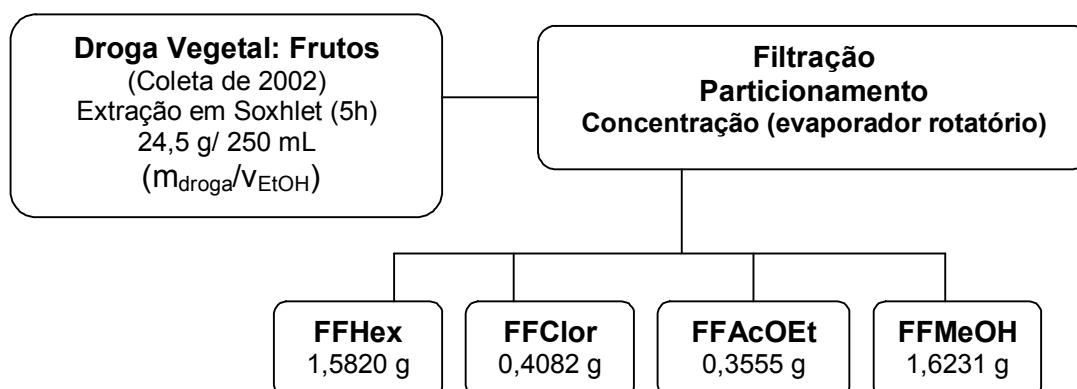
O particionamento do EB_{EtOH} dos frutos obtido a partir da droga vegetal coletada em 2002 foi realizado pelo mesmo processo anteriormente descrito para a partição do EB_{EtOH} dos órgãos totais (partição L/L, a frio).

As fases obtidas do EB_{EtOH} dos frutos, após concentração em evaporador rotatório (40°C) até quase completa secura, foram denominadas de fase hexano (FFHex), fase clorofórmio (FFClor), fase acetato de etila (FFAcOEt) e fase metanólica (FFMeOH). A FFHex (1,5820 g) foi submetida à cromatografia de coluna (CC), onde uma pastilha foi preparada. Para tal, a FFHex foi acrescida de 2 partes de sílica gel 60 em relação ao seu peso e evaporada à secura, sob constante homogeneização e leve aquecimento. Em seguida, esta pastilha foi cromatografada em uma coluna de 3 cm de diâmetro e 40 cm de altura, com 50 g de sílica gel 60 (70-230 mesh), e eluída inicialmente com hexano:acetato de etila (100:00 - v/v), num gradiente de polaridade crescente, aumentando-se a proporção de acetato de etila na ordem de 5%, até acetato de etila puro. Em seguida, a eluição foi realizada com acetato de etila e metanol, em concentração de metanol crescente na ordem de 5%, até metanol puro. Os eluatos foram coletados em frascos de 20 mL. As frações que apresentaram o mesmo perfil cromatográfico após monitoramento por CCD, foram reunidas e deixadas em repouso, para evaporação lenta do solvente.

O isolamento de substâncias foi obtido pela precipitação de sólidos ou cristais nas frações reunidas.

A obtenção do extrato e de suas fases pode ser visualizada na Figura 11.

FIGURA 11 – FLUXOGRAMA DA EXTRAÇÃO E PARTICIONAMENTO DO EXTRATO OBTIDO DOS FRUTOS DE *Ottonia martiana*.



3.3.3 Obtenção do EBEtOH das Raízes de *O. martiana* (coleta de 2003)., Particionamento e Isolamento de Substâncias Bioativas

Raízes secas e moídas de *O. martiana* (0,47 kg) foram submetidas à extração a quente, em Soxhlet modificado (Figura 10), com etanol (95%), durante 5 horas. Após concentração em evaporador rotatório sob pressão reduzida (40°C), armazenamento em frasco âmbar, conservação em freezer por 24 horas (para precipitação de pigmentos) e filtração a vácuo, o EBEtOH das raízes foi obtido.

O particionamento do EBEtOH das raízes foi realizado pelo processo de partição L/L (a quente), sendo o EBEtOH transferido para um Soxhlet, durante 5 horas, com sucessivos solventes de polaridades crescentes. A partição foi realizada inicialmente com hexano (250 mL). A fase solúvel em hexano foi reservada e o resíduo foi novamente particionado com 250 mL de clorofórmio. A fase clorofórmio também foi reservada e o resíduo foi novamente particionado com acetato de etila (250 mL) e posteriormente com metanol (250 mL).

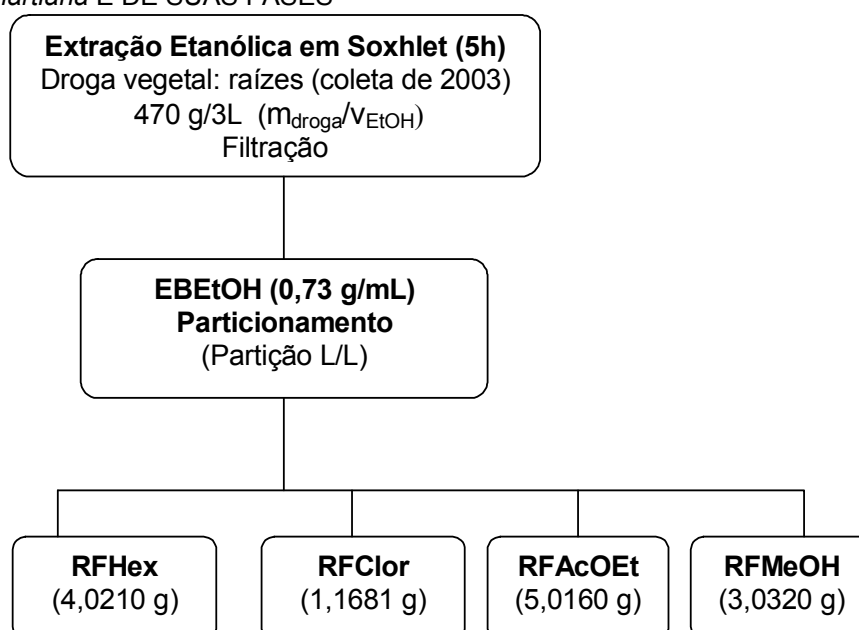
As fases obtidas dos EBEtOH das raízes foram concentradas em evaporador rotatório (40°C), até quase completa secura. Estas fases foram

denominadas de fase hexano (RFHex), fase clorofórmio (RFClor), fase acetato de etila (RFAcOEt), fase metanólica (RFMeOH), as quais foram submetidas à cromatografia de coluna (CC), para isolamento de substâncias bioativas. É importante esclarecer que as CC foram realizadas nas mesmas condições anteriormente descritas para a FFHex.

O resíduo da RFHex (RrFHex - 874,1 mg) obtido após concentração em evaporador rotatório também foi submetido à CC, nas mesmas condições anteriormente descritas. As frações que apresentaram o mesmo perfil cromatográfico no monitoramento por cromatografia de camada delgada (CCD), foram reunidas e deixadas em repouso, para evaporação lenta do solvente e precipitação de substâncias. Para a separação de componentes de misturas realizou-se uma cromatografia preparativa por CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência).

A obtenção do EBEtOH das raízes de *O. martiana*, e de suas fases pode ser visualizada na Figura 12, a seguir.

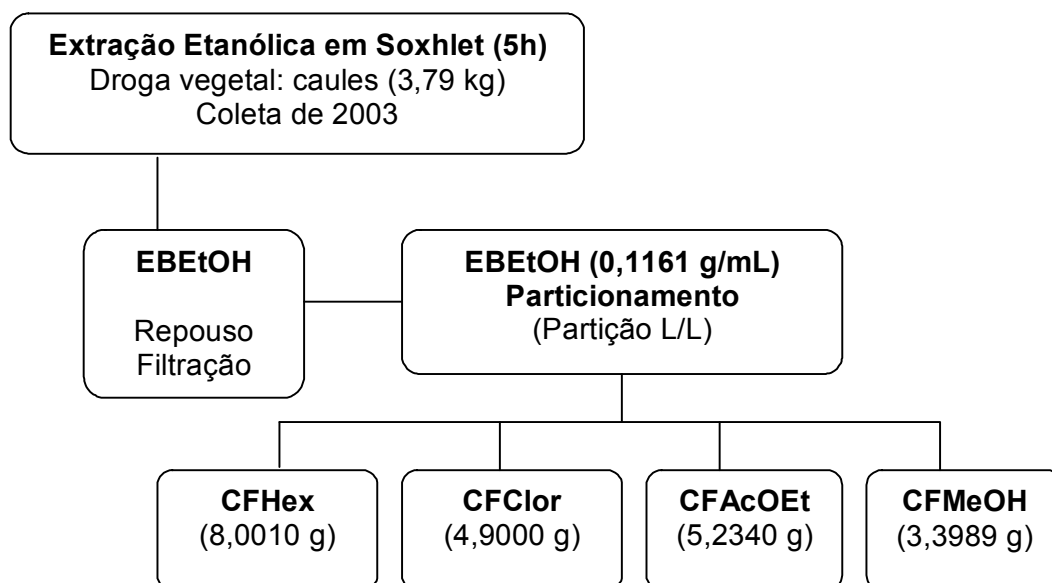
FIGURA 12 – FLUXOGRAMA DA OBTENÇÃO DO EXTRATO DAS RAÍZES DE *Ottonia martiana* E DE SUAS FASES



3.3.4 Obtenção de EB_{EtOH} dos Caules de *O. martiana* (coleta de 2003), Particionamento e Isolamento de Substâncias Bioativas

O EB_{EtOH} dos caules secos e moídos de *O. martiana* (3,79 kg), assim como o seu particionamento foi obtido em Soxhlet modificado (a quente), nas mesmas condições descritas para o EB_{EtOH} das raízes desta espécie vegetal. As fases obtidas no particionamento do EB_{EtOH} foram denominadas de fase hexano (CFHex), fase clorofórmio (CFClor), fase acetato de etila (CFAcOEt) e fase metanólica (CFMeOH). A CFHex (8,0010 g) foi submetida à CC, nas mesmas condições descritas anteriormente para a FFHex, e as frações que apresentaram o mesmo perfil cromatográfico na CCD, foram reunidas e deixadas em repouso, para evaporação lenta do solvente e precipitação de substâncias e/ou misturas de substâncias. A obtenção deste extrato, assim como de suas fases, pode ser visualizada na Figura 13, a seguir.

FIGURA 13 – FLUXOGRAMA DA EXTRAÇÃO, PARTICIONAMENTO E ISOLAMENTO DE SUBSTÂNCIAS PRESENTES NOS CAULES DE *Ottonia martiana*.

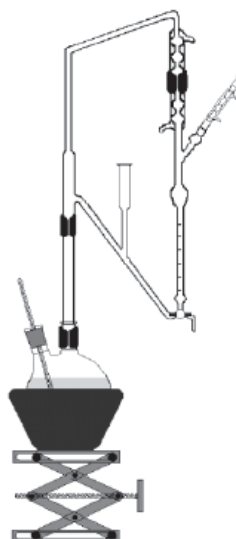


3.3.5 Extração de Óleos Essenciais (coleta de 2003)

A RFHex filtrada (2,8061 g) obtida do EBEtOH das raízes de *O. martiana* foi submetida à cromatografia em coluna (CC), nas mesmas condições anteriormente descritas para a FFHex. Após monitoramento por CCD, as frações oleosas que apresentaram o mesmo perfil cromatográfico de óleo essencial foram reunidas.

Folhas secas (15 g) e frutos secos (30 g) de *O. martiana* foram moídos e submetidos separadamente à extração por arraste de vapor d'água, em um equipamento do tipo Clevenger modificado (Figura 14), durante 6 horas.

FIGURA 14 – CLEVENGER MODIFICADO

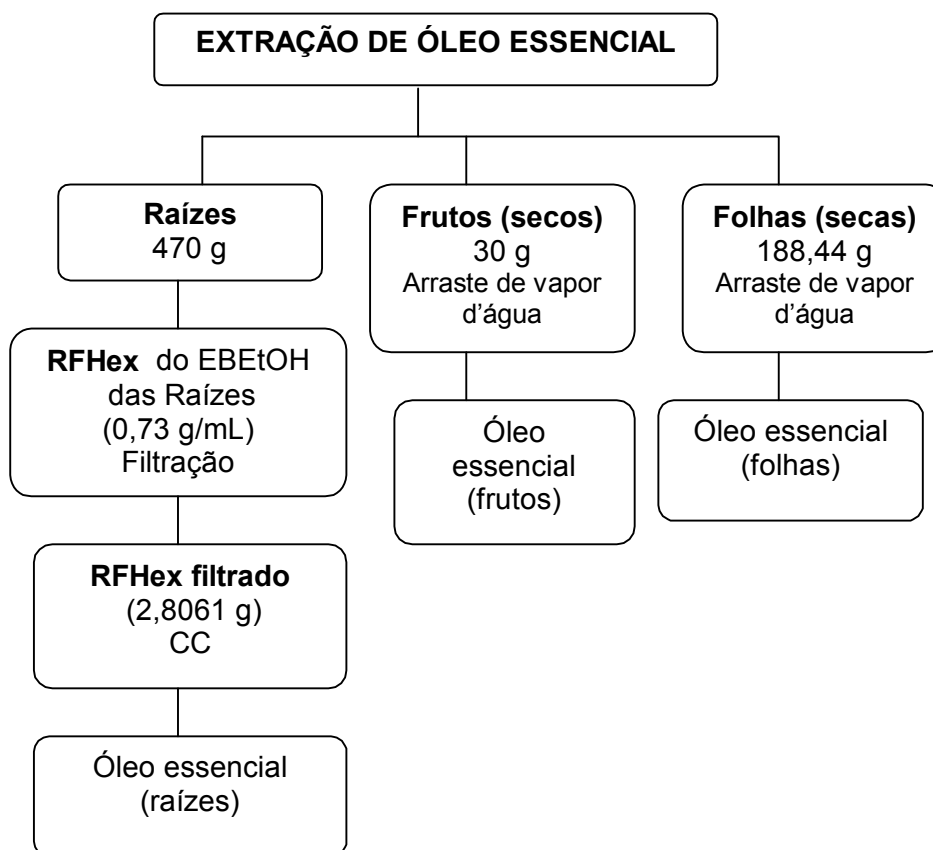


FONTE: SILVA et al. (2003)

Os óleos essenciais obtidos das raízes, frutos e das folhas foram acondicionados em recipientes apropriados e armazenados em freezer (24 h) para retirada de água e posterior análise.

A obtenção destes óleos essenciais pode ser visualizada na Figura 15, a seguir.

FIGURA 15 – FLUXOGRAMA DA EXTRAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS FOLHAS, FRUTOS E RAÍZES DE *Ottonia martiana*.



3.4 CARACTERIZAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS E IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS

Os óleos essenciais foram analisados por meio de cromatografia gasosa (CG-FID), cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG/EM), e os seus constituintes identificados por pesquisa computacional em biblioteca de substâncias SATURN 2000, índices de retenção, interpretação de espectros de

massas e comparação com amostras autênticas, dados da literatura e biblioteca eletrônica NIST.

Todas as substâncias e misturas orgânicas foram identificadas por CG/EM e/ou espectrometria de ressonância magnética nuclear RMN ^1H e RMN ^{13}C (Dept 135).

Os sais inorgânicos foram identificados por meio de análise qualitativa de cátions e ânions e por Difração de Raios-X (DRX).

3.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Para a determinação da atividade antibacteriana dos extratos brutos, das fases e/ou substâncias isoladas de *O. martiana*, foi utilizado o método da difusão em ágar (cavidade em gel e discos de papel) e bioautografia (WELTZIEN, 1958), ambos adaptados das modificações sugeridas por ROMEIRO (2001).

Nos ensaios foram empregadas cepas que podem ser encontradas na microbiota oral humana tais como *Streptococcus mutans* (ATCC 27175), *Streptococcus mitis* (ATCC 49456), *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19615), *Streptococcus salivarius* (ATCC 25975), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538, 25923 e 29737), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Escherichia coli* (ATCC 11229 e 25922), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Salmonella choleraesuis* (ATCC 10708) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), além de isolados de amostras clínicas de *Staphylococcus saprophyticus*, *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, devidamente identificados, e de microrganismos patogênicos humanos relacionados a infecções nosocomiais, tais

como *Enterococcus faecium* (ATCC 6569), *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442).

Para os microrganismos microaerófilos facultativos (anaerobiose facultativa) o meio utilizado nos bioensaios foi BHI (*brain heart infusion* - Difco). Os meios NA (*nutrient agar* - Difco) e Ágar Mueller-Hinton para os demais microrganismos da microbiota oral. Para os microrganismos relacionados a infecções nosocomiais, utilizou-se o meio PCA (*plate count agar* - Difco).

As cepas e isolados dos microrganismos testados foram fornecidos pelo Laboratório de Patologia Básica da UFPR e pelo TECPAR – PR.

Os resultados obtidos na avaliação antibacteriana (média dos halos de inibição de crescimento bacteriano) foram analisados estatisticamente por meio do teste *t* de Student (com limite de confiança de 95%).

3.5.1 Teste de Difusão em Ágar

3.5.1.1 Discos de papel

Cada meio apropriado para os microrganismos testados foi respectivamente fundido e vertido nas placas de Petri, de modo que formasse uma camada de mais ou menos 6 mm de espessura.

Para o preparo do inóculo, cepas e isolados de bactérias a serem testadas foram previamente repicadas em meio apropriado e incubadas a 37°C, 24 horas antes do bioensaio.

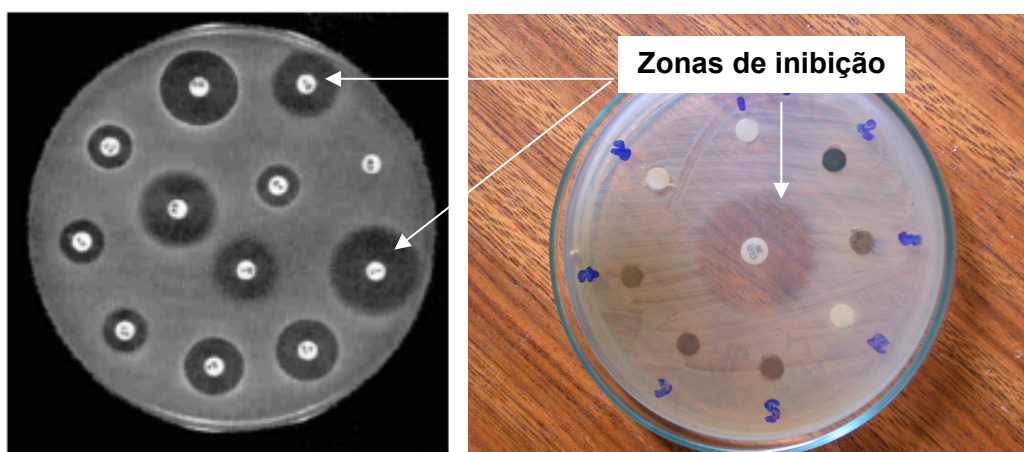
A suspensão bacteriana em salina foi padronizada por comparação com a escala 0,5 de MacFarland ($1,5 \times 10^8$ células mL⁻¹).

Um “swab” (cotonete) de algodão estéril foi embebido na suspensão bacteriana previamente padronizada e, em seguida procedeu-se a semeadura na superfície do meio das placas de Petri previamente preparadas, tomando-se o devido cuidado de distribuir o inóculo de maneira uniforme.

Discos de papel (diâmetro de 5 mm) impregnados com EBEtOH (32,9 µg), cloranfenicol (30 µg - Newprov) e solvente do respectivo extrato foram distribuídos sobre a superfície do meio inoculado.

O teste foi realizado em triplicata e as placas inoculadas foram incubadas em estufa a 37°C durante 24 horas. Passado este período, as placas foram retiradas da estufa e medidos os halos de inibição, quando presentes (Figura 16).

FIGURA 16 – HALOS DE INIBIÇÃO EM TESTE ANTIMICROBIANO DE DIFUSÃO EM ÁGAR (DISCOS DE PAPEL)



FONTE: FOTOS DE NASCIMENTO (2003) E DA AUTORA (2005)

3.5.1.2 Cavidade em camada dupla (poço)

Cada meio apropriado para os microrganismos testados foi respectivamente fundido e vertido nas placas de Petri, de modo a formar uma camada básica de mais

ou menos 1 mm de espessura, a fim de garantir a uniformidade em termos de espessura da sobrecamada corrigindo desta forma eventuais desníveis e irregularidades existentes no fundo da placa. Para o preparo do inóculo, cepas e isolados de bactérias a serem testadas foram previamente repicadas em meio apropriado e incubadas a 37°C, 24 horas antes do teste.

A suspensão bacteriana em salina foi padronizada por comparação com a escala 0,5 de MacFarland ($1,5 \times 10^8$ células mL⁻¹). No momento da inoculação das placas, 1 mL de cada suspensão padronizada foi adicionado a 100 mL de meio fundido, à temperatura de 45°C.

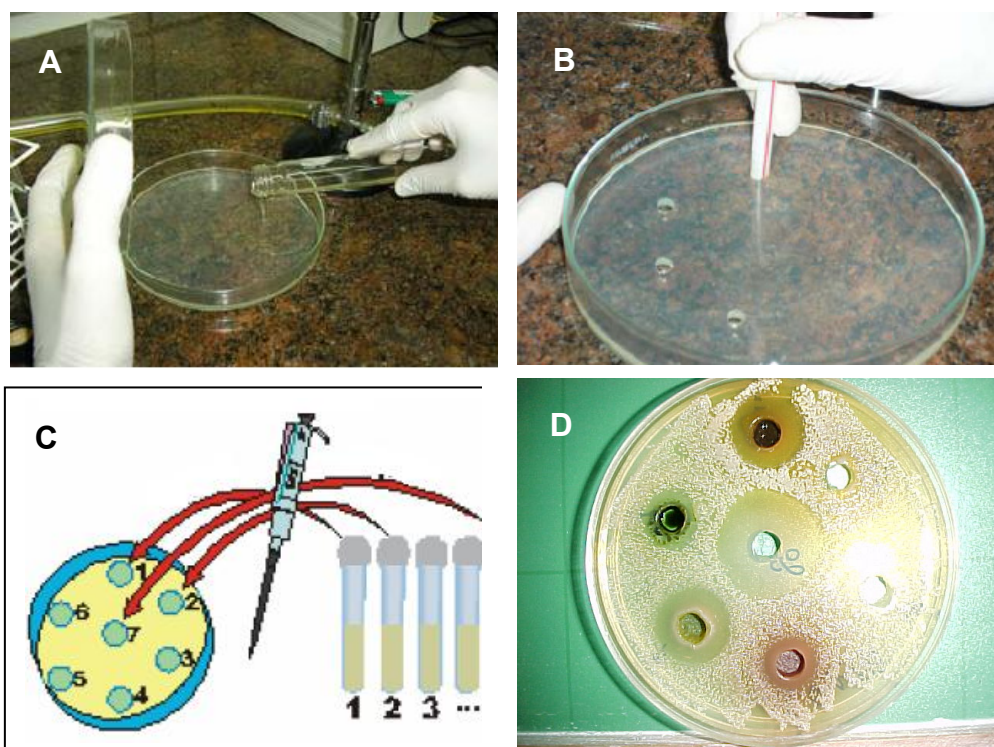
Antes da solidificação, 10 mL de meio inoculado foi transferido para a superfície da camada básica das placas previamente preparadas. Após solidificação da sobrecamada, placas de camada dupla foram obtidas.

Orifícios circulares na sobrecamada com auxílio de um furador de ágar foram feitos, removendo-se a seção circular do ágar e deixando-se em seu lugar uma cavidade. Alíquotas conhecidas (0,05 mL = 1,625 mg) do EBEtOH dos órgãos totais (32,9 mg mL⁻¹) foram dispensadas nas cavidades.

Utilizou-se uma solução de digluconato de clorexidina (0,2%) como controle positivo. Como controle negativo foram utilizados volumes equivalentes dos solventes presentes nos respectivos extratos.

O teste foi realizado em triplicata e as placas inoculadas foram incubadas em estufa a 37°C por 24 horas. Passado este período, as placas foram retiradas da estufa e medidos os halos de inibição, quando presentes (Figura 17).

FIGURA 17 – ETAPAS DO TESTE ANTIMICROBIANO DE DIFUSÃO EM ÁGAR (CAVIDADES EM GEL)



A – formação da 2ª. camada com meio inoculado
 B – perfuração do meio inoculado para formar cavidades (poços)
 C – adição de amostras nas cavidades perfuradas
 D – visualização de halos de inibição microbiana
 FONTE: FOTOS DE REIS (2006) E DA AUTORA (2005)

3.5.1.3 Bioautografia

A suspensão bacteriana em salina foi padronizada pela escala 0,5 de MacFarland.

Volumes de 3 μL (98,7 μg) do EBEtOH dos órgãos totais (32,9 mg mL^{-1}), FHex (1 mg mL^{-1}), FClor (1 mg mL^{-1}), FAcOEt (1 mg mL^{-1}), FMeOH (1 mg mL^{-1}), e as amidas previamente isoladas piperovatina (0,1 mg mL^{-1}) e isopiperlonguminina (0,1 mg mL^{-1}) foram aplicados sobre placas de sílica gel GF₂₅₄ (2,5 x 5,0 cm), as quais foram submetidas ao sistema eluente hexano:acetato de etila (70:30), secagem e

devidamente acondicionadas em placas de Petri, onde verteram-se os meios de cultura contendo as suspensões bacterianas previamente padronizadas e cloreto de trifeniltetrazolium (TTC - 1%).

As placas foram incubadas em estufa a 37 °C. Após nítido crescimento dos microrganismos (24-48 h), observou-se, quando presentes, a ocorrência de zonas de inibição. Digluconato de clorexidina (0,2%) e cloranfenicol (30 µg - Newprov) foram utilizados como controle positivo de inibição de crescimento.

Solventes presentes no extrato e nas suas fases foram respectivamente utilizados como controle negativo de crescimento bacteriano. O teste foi realizado em triplicata.

Um exemplo de ocorrência de zonas de inibição de crescimento bacteriano pode ser visualizado na Figura 18, a seguir.

FIGURA 18 – BIOAUTOGRAMAS COM ZONAS DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO DE *S. aureus*



FONTE: AUTORA (2006)

Os óleos essenciais obtidos das folhas, frutos e das raízes de *O. martiana* também foram bioautografados frente a *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa* e *E. coli*, utilizando-se o mesmo procedimento bioautográfico descrito anteriormente.

Entretanto, nas cromatoplasas utilizou-se tolueno:acetato de etila (93:07 – v/v) como fase móvel.

3.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

Para avaliar o potencial antifúngico do EB_{EtOH} dos órgãos totais de *O. martiana* (32,9 mg mL⁻¹) frente aos isolados fitopatogênicos *Cylindrocladium spathulatum* e *Botrytis cinerea*, ambos fornecidos pela EMBRAPA Florestas - Colombo (PR), utilizou-se o método do crescimento micelial adaptado de AUER e BETTIOL (1986), segundo as modificações propostas por CUNICO et al. (2004).

Também foram empregados os testes de germinação de esporos, o teste *in vivo* das folhas destacadas e das mudas e o teste de bioautografia direta, adaptados de STANGARLIN et al. (1999), QUIRINO et al. (1999) e HOMANS e FUCHS (1970), respectivamente.

3.6.1 Teste da Influência do EB_{EtOH} sobre o Crescimento Micelial (Fitopatógenos)

Os EB_{EtOH} dos órgãos totais (raízes, caules, frutos e folhas) filtrado em membrana Millipore (0,22 µm) e autoclavado (a 120°C, 1 atm, durante 15 minutos), foram incorporados separadamente em meio de cultivo BDA (Batata-Dextrose-Ágar), cada um nas concentrações de 1, 10, 100 e 1000 ppm.

O meio BDA contendo extrato foi vertido em placas de Petri (15 cm de diâmetro) e após 48 horas, discos de micélio-ágar com 5 mm de diâmetro de *C. spathulatum* e *B. cinerea*, retirados das culturas puras com 7 dias de idade em meio BDA, foram transferidos isoladamente para o centro de cada placa nos substratos

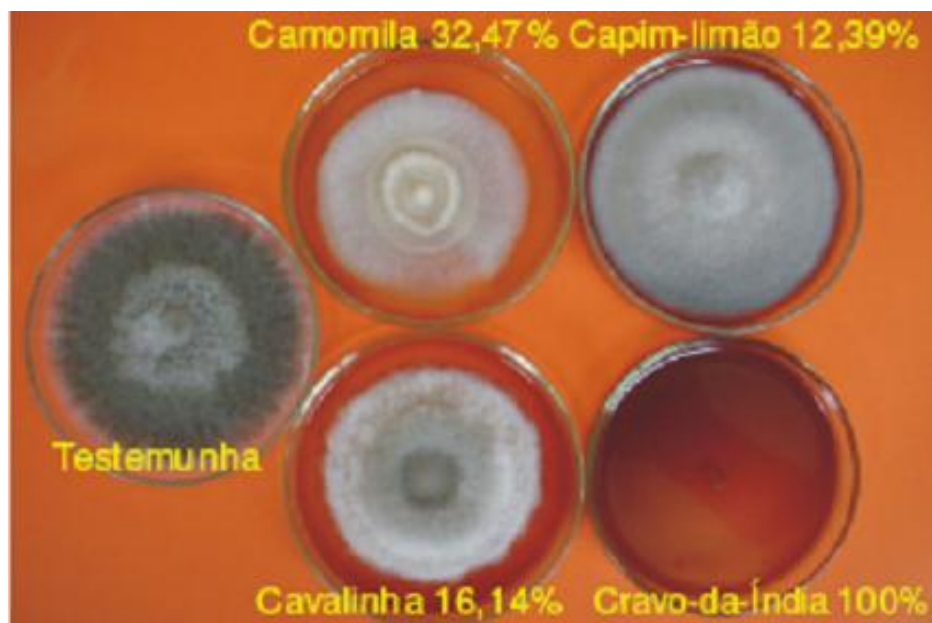
preparados. A seguir, as placas foram incubadas a 25°C no escuro, após vedação com filme plástico.

O tratamento contendo apenas o meio BDA foi utilizado como controle positivo de crescimento micelial. O fungicida Benomyl (1; 10; 100 e 1000 ppm) foi utilizado como controle negativo de crescimento micelial. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 6 repetições.

As avaliações foram realizadas por meio de medições do diâmetro das colônias (média de duas medidas perpendiculares), no momento em que as colônias fúngicas do controle de crescimento micelial atingiram aproximadamente a superfície total do meio de cultura.

Um exemplo da influência de extratos vegetais sobre o crescimento micelial de fitopatógenos encontra-se inserido na Figura 19.

FIGURA 19 – VISUALIZAÇÃO DA INIBIÇÃO (%) DO CRESCIMENTO MICELIAL (IN VITRO) DE *Glomerella cingulata* FRENTE A EXTRATOS VEGETAIS



FONTE: ROZWALKA (2003)

3.6.2 Teste da Germinação de Esporos

Para o preparo da suspensão de inóculo foram utilizadas culturas monospóricas, a fim de se diminuir a variabilidade da espécie em estudo.

As suspensões de esporos foram preparadas a partir de colônias dos isolados dos fungos cultivados em meio BDA, pela raspagem da mesma com uma alça, quando a ela são adicionadas 10 mL de água estéril, e transferência posterior do material para um tubo de ensaio. Em seguida, uma alíquota de 1 mL da suspensão de esporos obtida foi colocada em uma lâmina de vidro e verificou-se a concentração de esporos presentes, por meio de um microscópio óptico, procedendo-se ajustes quando necessário.

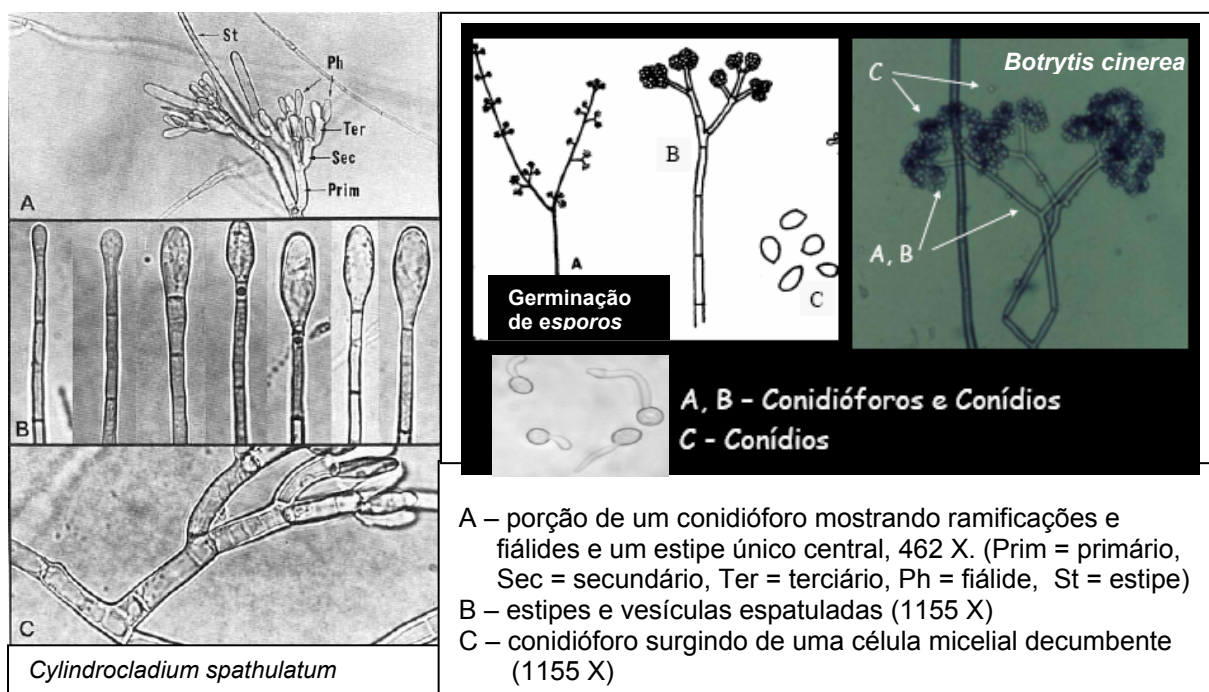
O ensaio de germinação de esporos foi montado colocando-se em cada placa de Petri um disco de papel de filtro úmido (água destilada) esterilizado, uma lâmina de vidro e três discos de 8 mm de diâmetro de meio BDA (20 g/L) contendo 100 µL do EBEtOH dos órgãos totais de *O. martiana* (1000 ppm), 100 µL do controle negativo de germinação (Benomyl – 1000 ppm) e 100 µL do controle positivo de germinação (água estéril), respectivamente. Sobre os discos foram colocados 100 µL da suspensão de esporos de *C. spathulatum* previamente padronizada ($1,75 \times 10^6$ esporos mL⁻¹) e 100 µL de água estéril. Em seguida, as placas foram levadas à incubadora BOD a uma temperatura aproximada de 24°C.

A cada hora foram realizadas leituras em cada tratamento, quantificando-se a germinação de 100 esporos de cada quadrante (4) e do ponto central. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 5 repetições. Após o período de 5 horas de incubação, 20 µL de lactofenol-azul de metileno foi colocada em cada disco para a leitura final, considerando-se germinado os tubos germinados

que se apresentassem maior ou igual (\geq) à metade do tamanho do conídio. Frente a *B. cinerea* ($1,5 \times 10^6$ esporos mL^{-1}), empregou-se o mesmo procedimento utilizado no bioensaio contra *C. spathulatum*.

Germinação de esporos e conídios de *C. spathulatum* e *B. cinerea* podem ser visualizados na Figura 20, a seguir.

FIGURA 20 – MICROMORFOLOGIA DOS FITOPATÓGENOS *Cylindrocladium spathulatum* E *Botrytis cinerea*



FONTE: EL-GHOLL et al. (1986); CARRERO et al. (2003)

3.6.3 Teste *In Vivo*

3.6.3.1 Teste da lesão foliar em folhas destacadas

Para o teste, folhas de erva-mate foram colhidas ($n=10$), lavadas com água estéril e solução do EBEtOH dos órgãos totais de *O. martiana* (1000 ppm), 24 horas

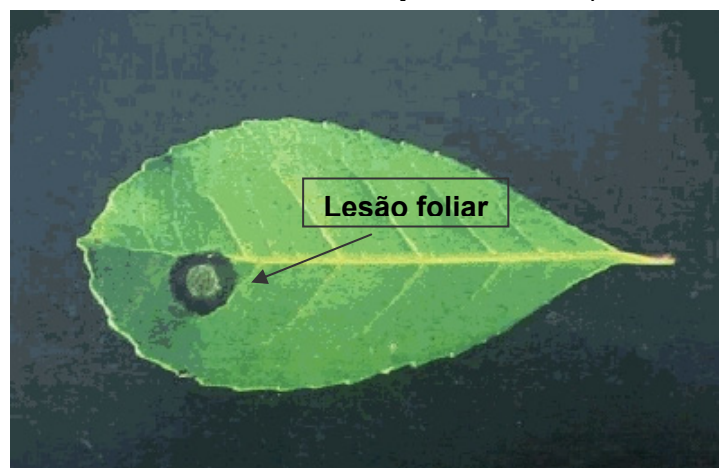
antes do experimento. Em seguida, foram acondicionadas em bandejas forradas com papel de filtro úmido e estéril, com a parte abaxial voltada para cima.

Para o controle positivo de lesão foliar, folhas de erva-mate foram colhidas (n=10), lavadas com água estéril e acondicionadas em bandejas forradas com papel de filtro estéril e úmido, com a parte abaxial voltada para cima, 24 horas antes do experimento. Para o controle negativo de lesão foliar, folhas de erva-mate foram colhidas (n=10), lavadas com água estéril e solução fungicida Benomyl (1000 ppm), também 24 horas antes do experimento.

Após o período de 24 horas, discos de papel (6 mm) impregnados com suspensões de conídios de *C. spathulatum* ($1,75 \times 10^6$ esporos mL^{-1}) foram colocados sobre as folhas (2 discos por folha). Passados 7 dias, fez-se a leitura medindo-se a área das lesões foliares causadas pelo fungo (2 medidas diametralmente opostas). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 5 repetições.

Para o bioensaio contendo suspensão de *B. cinerea* ($1,5 \times 10^6$ esporos mL^{-1}) e folhas de eucalipto destacadas, o procedimento anteriormente descrito foi adotado.

FIGURA 21 – LESÃO EM FOLHA DESTACADA DE ERVA-MATE CAUSADA POR *Cylindrocladium spathulatum*



FONTE: AUTORA (2005)

3.6.3.2 Teste em mudas de erva-mate e eucalipto

Mudas de erva-mate e de eucalipto foram previamente separadas para o bioensaio *in vivo* (erva-mate, n=15; eucalipto, n=15). Em seguida, todas as mudas foram pulverizadas com água estéril, reservando-se 5 mudas de erva-mate e 5 mudas de eucalipto (n=5), para controle positivo da pinta-preta e mofo cinzento, respectivamente. Em cada muda, 2 folhas foram lesionadas com 4 pequenos furos.

Também foram reservadas 5 mudas de erva-mate e 5 mudas de eucalipto, as quais foram tratadas (pulverizadas) com solução do EBEtOH dos órgãos totais de *O. martiana* (1000 ppm). Como controle negativo, as mudas restantes de erva-mate (5) e de eucalipto (5) foram pulverizadas com fungicida (1000 ppm).

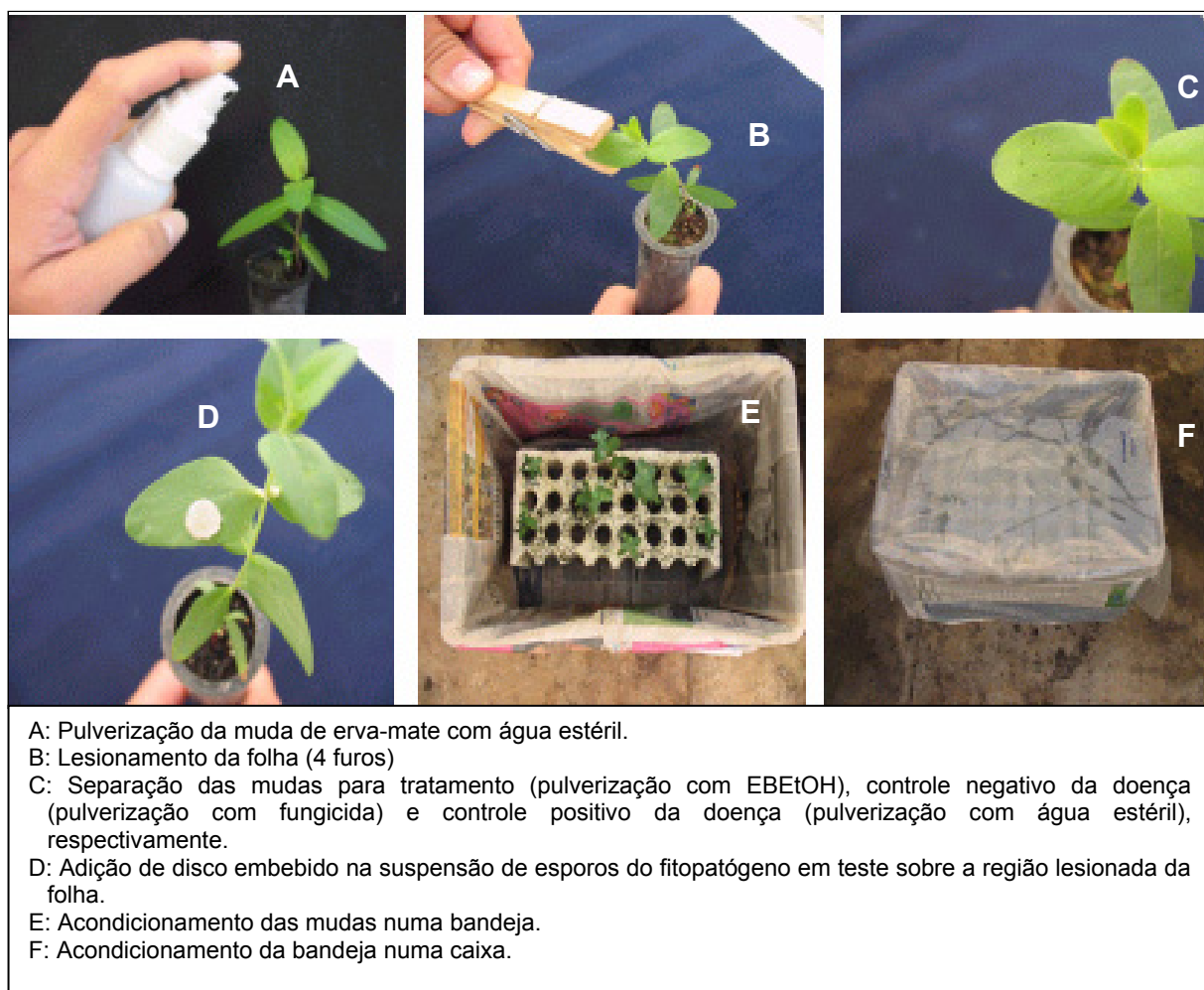
Após 24 horas, discos de papel de filtro estéril foram embebidos na suspensão de esporos dos fungos e colocados sobre as folhas lesionadas das mudas de erva-mate e eucalipto (2 discos por folha), respectivamente. Em seguida, todas as mudas foram acondicionadas na estufa em bandejas forradas com papel de filtro úmido e estéril e após 7 e 14 dias, fez-se a leitura avaliando-se os sintomas apresentados por cada muda ensaiada.

Como controle negativo da doença pinta-preta na erva-mate foi utilizado o fungicida Benomyl. Rovral foi utilizado como controle negativo da doença nas mudas de eucalipto. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 5 repetições.

As mudas de erva-mate foram testadas frente ao fungo *C. spathulatum* ($1,75 \times 10^6$ esporos mL⁻¹), e as mudas de eucalipto frente ao fitopatógeno *B. cinerea* ($1,5 \times 10^6$ esporos mL⁻¹).

Etapas deste bioensaio descrito anteriormente podem ser visualizadas na Figura 22, a seguir.

FIGURA 22 – ETAPAS DO BIOENSAIO ANTIFÚNGICO EM MUDAS DE ERVA-MATE



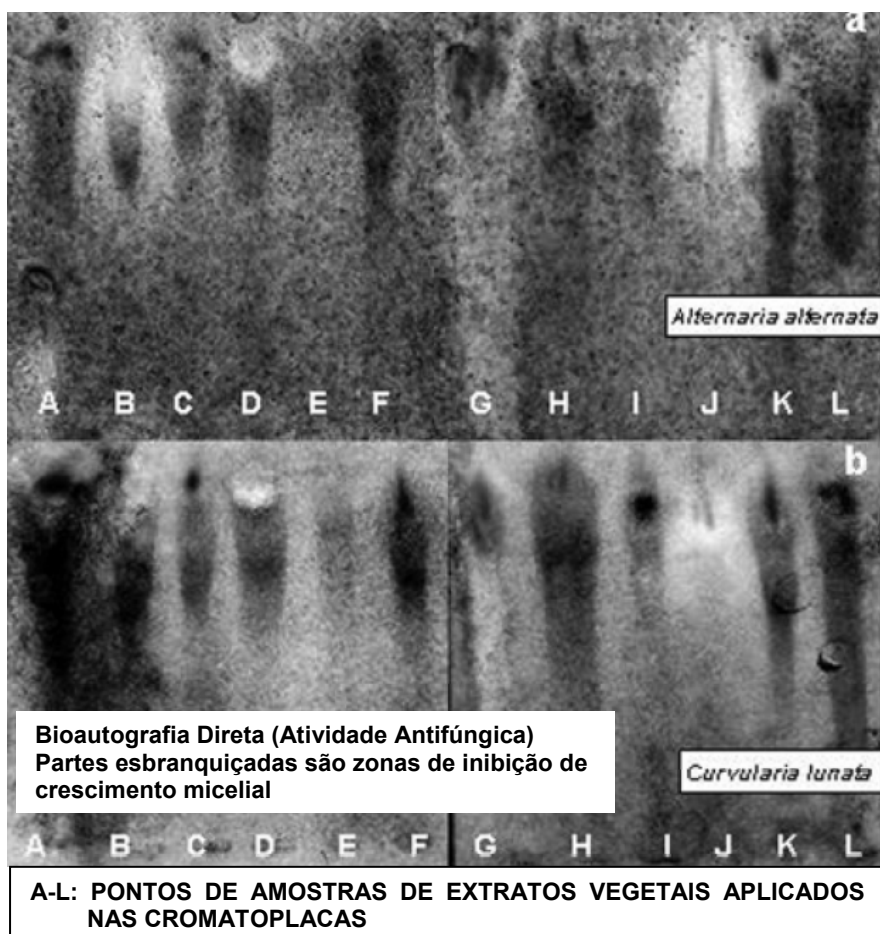
FONTE: AUTORA (2006)

3.6.4 Bioautografia Direta

Volumes de 10 μL do EBEtOH dos órgãos totais ($32,9 \text{ mg mL}^{-1}$) e das fases FHex (1 mg mL^{-1}), FClor (1 mg mL^{-1}), FAcOEt (1 mg mL^{-1}) e FMeOH (1 mg mL^{-1}), além do controle negativo de crescimento micelial (Benomyl - 1000 ppm) foram aplicados sobre placas de sílica gel GF₂₅₄ (2,5 x 5,0 cm), as quais foram submetidas

ao sistema eluente hexano:acetato de etila (70:30), secagem e devidamente acondicionadas em placas de Petri, onde verteu-se o meio de cultura (BDA) contendo a suspensão de esporos de *C. spathulatum* previamente padronizada ($1,75 \times 10^6$ esporos mL^{-1}). Em seguida, as placas foram incubadas em BOD a 25 °C e luz. Após nítido crescimento dos microrganismos (48 a 72 h), observou-se, quando presentes, a ocorrência de zonas de inibição (Figura 23). O teste foi realizado em triplicata. O mesmo procedimento foi empregado com a suspensão de esporos de *B. cinerea* ($1,5 \times 10^6$ esporos mL^{-1}), onde se utilizou Rovral (1000 ppm) como controle negativo de crescimento micelial.

FIGURA 23 – BIOAUTOGRAFIA DIRETA DE EXTRATOS DE FOLHAS DE PLANTAS MEDICINAIS DO HIMALAIA



FONTE: GULERIA; KUMAR (2006)

3.6.5 Análise Estatística

Como o delineamento experimental da atividade antifúngica foi inteiramente casualizado, na análise estatística dos resultados obtidos empregou-se o Teste de Tukey com limite de confiança de 95%, utilizando-se o programa SANEST (ZONTA; MACHADO; SILVEIRA, 1984).

3.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA

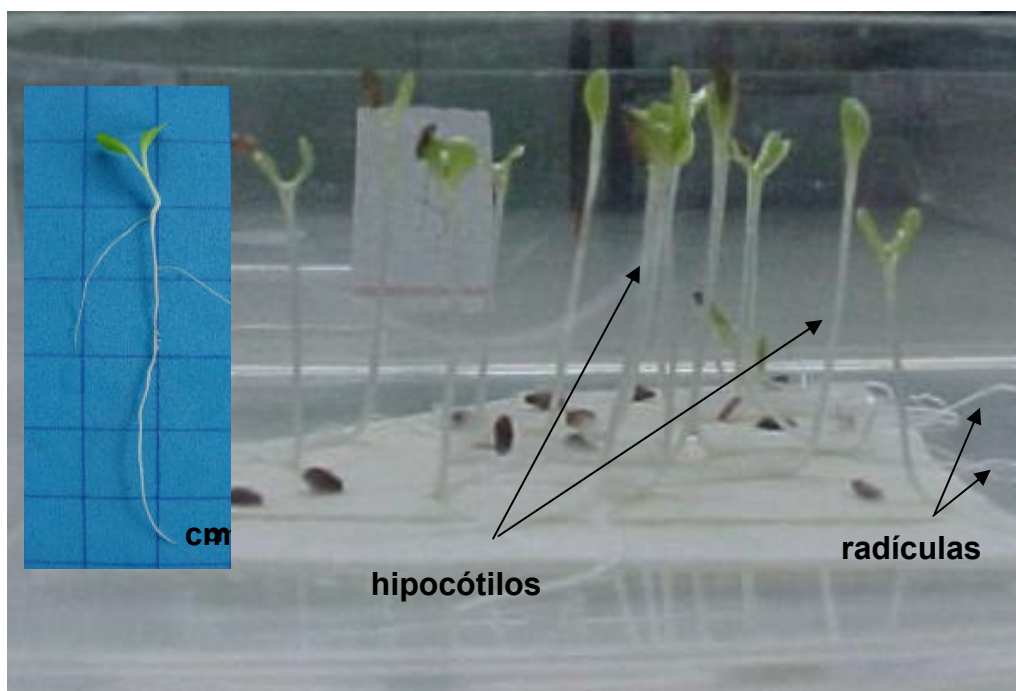
3.7.1 Determinação do Efeito Alelopático sobre Sementes de *Lactuca sativa*

Para o ensaio foram utilizadas sementes de *L. sativa* (alface), classe fiscalizada, cultivar Babá, com índice de 99% de viabilidade detectado por meio de teste padrão de germinação. Folhas de papel Whatman (nº 6) foram colocadas em caixa Gerbox, embebidas em soluções contendo EBEtOH dos órgãos totais de *O. martiana* (0,1 mg mL⁻¹; 0,2 mg mL⁻¹; 0,4 mg mL⁻¹ e 0,8 mg mL⁻¹ por caixa), FHex, FClor, FAcOEt, FmeOH, piperovatina, isopiperlonguminina e mistura de piperovatina com isopiperlonguminina (MPI). O conjunto secou em estufa a 40 °C por 12 horas. Após evaporação do solvente, 3 mL de água destilada foram adicionados à cada caixa Gerbox.

Para testar cada amostra, foram distribuídas 25 sementes por caixa e, após a semeadura, as caixas foram colocadas para germinar em um germinador tipo Mangelsdorf, marca Biomatic, previamente regulado a 17 °C, com limite mínimo de 16,8°C e máximo 17,2°C. Não foi considerado o fotoperíodo, uma vez que não há exigência da espécie. Após 7 dias da semeadura, foram realizadas as leituras dos

comprimentos da radícula e do hipocótilo em papel milimetrado, comparando-se a média dos comprimentos da radícula e hipocótilo dos ensaios teste com a média de crescimento dos respectivos controles (Figura 24).

FIGURA 24 – CRESCIMENTO RADICULAR E DE HIPOCÓTILOS DE PLÂNTULAS DE ALFACE



FONTE: AUTORA (2006)

3.7.2 Teste de Germinação de Sementes

Foram utilizadas 25 sementes de *L. sativa* (alface), para avaliação diária da germinação das sementes. O EBEtOH de *O. martiana*, fases (FHex, FClor, FacOEt e FMeOH) e substâncias previamente isoladas (piperovatina e isopiperlonguminina), assim como a mistura contendo piperovatina e isopiperlonguminina (1:3 – m/m), foram testados nas concentrações de 0,1 mg mL⁻¹; 0,2 mg mL⁻¹; 0,4 mg mL⁻¹ e 0,8 mg mL⁻¹.

Neste ensaio adicionou-se 1 mL de cada amostra na dupla camada de papel de filtro, previamente esterilizado e acondicionado em caixa Gerbox. O conjunto foi armazenado a 40 °C por 24 horas, para secar. Decorrido este tempo, para cada diluição adicionou-se 3 mL de água destilada estéril e distribuiu-se 25 sementes. Após a semeadura, as caixas contendo sementes foram colocadas para germinar em um germinador tipo Mangelsdorf, marca Biomatic, previamente regulado a 17 °C, com limite mínimo 16,8°C e máximo 17,2°C. Não foi considerado o fotoperíodo, uma vez que não há exigência da espécie. A leitura foi realizada diariamente durante 5 dias pela contagem do número de sementes que germinaram.

Água estéril e o solvente presente no extrato testado foram utilizados como controle positivo e negativo de germinação, respectivamente. Para o ensaio foram empregadas sementes de *L. sativa* (alface), classe fiscalizada, cultivar Babá, com índice de 99% de viabilidade, detectado por meio de teste padrão de germinação.

Etapas desta metodologia podem ser visualizadas na Figura 25, a seguir.

FIGURA 25 – ETAPAS DO BIOENSAIO ALELOPÁTICO DE GERMINAÇÃO DE SEMENTES



FONTE: GATTI (2003).

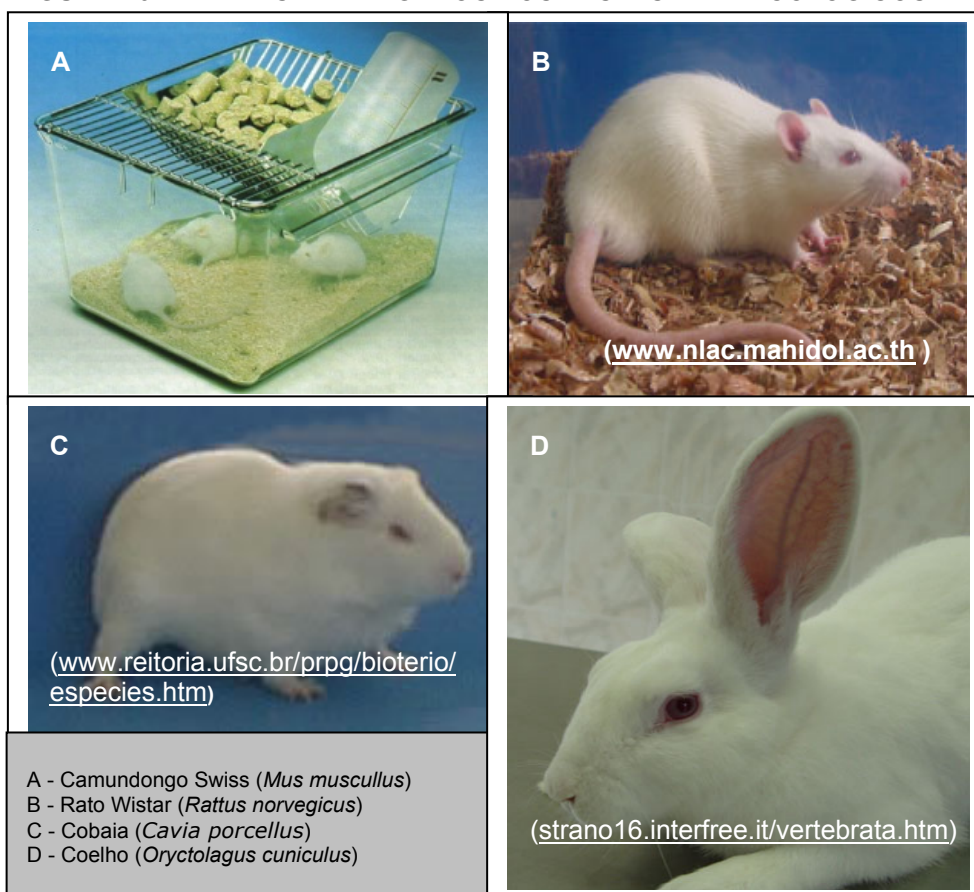
3.7.3 Análise Estatística

Como o delineamento experimental da atividade alelopática foi inteiramente casualizado, na análise estatística dos resultados obtidos empregou-se o Teste de Tukey com limite de confiança de 95%, utilizando-se o programa SANEST (ZONTA; MACHADO; SILVEIRA, 1984).

3.8 AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA

Os animais experimentais empregados nos testes farmacológicos [Camundongo Swiss (*Mus musculus*), Rato Wistar (*Rattus norvegicus*), Cobaia (*Cavia porcellus*) e Coelho (*Oryctolagus cuniculus*)] foram fornecidos pelo Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR (Figura 26).

FIGURA 26 – ANIMAIS EMPREGADOS NOS TESTES FARMACOLÓGICOS.



3.8.1 Ensaio da Irritação da Mucosa Oral

A realização deste ensaio foi de acordo com o indicado no Summary of Results of a Gingival Irritation Study (Johnson and Johnson Biosearch Incorporated, Philadelphia, Pensilvania, September, 1982).

Foram utilizados ratos albinos (machos e fêmeas provenientes da Granja Maria Luiza, do Instituto de Tecnologia do Paraná – TECPAR), nunca utilizados em ensaios.

Os animais foram mantidos em caixas apropriadas, em salas com temperatura constante ($22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$), com ciclos de 12 horas claro/escuro e umidade relativa do ar entre 30% e 70% e só foram utilizados após permanecerem por um período de confinamento de aproximadamente 7 dias (conforme IT - LATO/ 025). Após este período, estes animais (20 ratos) foram pesados, marcados com ácido pícrico nas posições cabeça (Cb), pescoço (P), dorso (D), cauda (Cd) e branco (B), para identificação e controle, e distribuídos, por sexo, em número de 5 por caixa.

O EBEtOH dos órgãos totais ($32,9 \text{ mg mL}^{-1}$) foi aplicado nestes animais na sua forma íntegra. Dez animais foram separados para o grupo teste (5 machos e 5 fêmeas), 5 ratos machos ou fêmeas para o controle positivo (solução 50% (p/p) de lauril sulfato de sódio em água destilada) e 5 ratos (machos ou fêmeas) para o grupo controle negativo (água destilada). A amostra e os 2 controles foram aplicados com cotonetes (saturados), durante 45 segundos, na junção labial (gengiva), no canto esquerdo da boca e na mucosa oral do lado esquerdo, em cada animal, 3 vezes ao dia durante 4 dias consecutivos. Os animais foram pesados ao final do ensaio.

As leituras foram realizadas antes de cada aplicação e durante 3 dias após o término das mesmas. Para tal, 3 leituras diárias para cada parâmetro avaliado foi necessário, utilizando-se o quadro de escores (Quadro 1).

QUADRO 1 - ESCORES PARA A LEITURA DOS RESULTADOS OBTIDOS NO ENSAIO DA IRRITAÇÃO DA MUCOSA ORAL

Mucosa Oral
0 - Negativo (sem reação em comparação ao controle negativo)
1 - Descoloração e descamação
2 - Escaras
3 - Ulceração
Junção Labial
0 - Negativo (sem reação em comparação ao controle negativo)
1 - Ressecamento
2 - Pequenas feridas
3 - Rachadura
Edema
0 - Negativo (sem reação em comparação ao controle negativo)
1 - edema sem bolhas
2 - uma ou mais bolhas com área até 1mm ²
3 - uma ou mais bolhas com área entre 1 e 2mm ²
4 - uma ou mais bolhas com área superior a 2mm ²

Após o término do ensaio calcularam-se as médias de cada leitura para os três parâmetros avaliados, somando-se todas as leituras de cada um deles e dividindo-se cada somatório por 3 (M_M = Média para as leituras de mucosa oral, M_J = Média para as leituras de junção labial e M_E = Média para as leituras de edema).

Em seguida calcularam-se as médias diárias somando-se todos os valores de M_M e M_J e dividindo-se esse somatório por 3 (MD_{MJ} = Média diária mucosa oral + Média diária junção labial).

A média diária de edema foi calculada somando-se todos os valores de M_E e dividindo-se também esse somatório por 3 (MD_E = Média diária edema).

Por último calcularam-se as médias finais para mucosa oral e junção labial (MF_{MJ}) e para edema (MF_E), somando-se separadamente todos os valores de MD_{MJ} e MD_E e dividindo-se cada um dos somatórios por 7.

Utilizando-se o valor da MF_{MJ} o produto foi classificado de acordo com a Tabela 3.

TABELA 3 - CLASSIFICAÇÃO DO PRODUTO ANALISADO EM RELAÇÃO AO VALOR DA MÉDIA FINAL PARA MUCOSA ORAL E JUNÇÃO LABIAL

Valor da Média Final (MF_{MJ})	Classificação do Produto
0,1 - 0,4	Irritante muito leve
0,5 - 1,0	Irritante leve
1,1 - 1,2	Irritante moderado
>2,1	Irritante severo

3.8.2 Teste Geral de Atividade (Toxicidade Aguda, Teste Hipocrático, Rastreamento das Doses e Dose Letal Mediana (DL_{50}))

Grupos de camundongos, machos e fêmeas ($n = 5$), foram injetados por via oral (v.o.) e intraperitoneal (i.p.) com diferentes doses do EBEtOH dos órgãos totais da *O. martiana* (40, 60 e 80 mg kg^{-1} , v.o. e 100, 150 e 200 mg kg^{-1} , i.p.).

Os animais do grupo controle foram injetados, pelas mesmas vias, com o mesmo veículo – salina contendo 15% etanol (v/v), em volumes equivalentes (0,1 mL/10g).

Os efeitos gerais produzidos pelos mesmos foram observados nos animais submetidos à deambulação livre sobre uma superfície plana (aquário de vidro) desde o primeiro minuto após a sua administração. Os animais foram observados intensamente na primeira hora e depois diariamente, por 14 dias.

O índice de mortalidade também foi verificado durante o período de tempo observado para posterior determinação da dose letal 50% (BRITO, 1994). Classicamente a dose letal mediana (dose que causa a morte de 50% dos animais) é obtida a partir do método gráfico, de uma reta de regressão a partir da relação da porcentagem de mortes transformada em probitos versus logaritmo da dose.

No presente trabalho foi utilizado um programa computacional – Programa Letal.exe, versão 1.3, elaborado em julho de 1991 por SAITO & CO SOFTWARE & SHAREWARE. Esse programa utiliza algoritmos de linearização complexos e rotinas de integração numérica e de cálculo iterativo para a obtenção do eixo de probabilidades no gráfico utilizado no método original, na modificação, para rotina computacional, do Método de LITCHFIELD & WILCOXON, de 1949 (método do gráfico). Assim, tornou-se possível utilizar-se de métodos de regressão linear, fornecendo resultados equivalentes àqueles obtidos no método gráfico.

3.8.3 Anestesia Tópica em Córnea de Coelhos (VOGEL, 2002)

Coelhos albinos de ambos os sexos (n=5), pesando 2 a 4 kg, foram colocados em caixas de contenção.

Os cílios foram cortados e com um fio de nylon a córnea foi tocada por 10 vezes e foram contados os números de reflexos palpebrais. Em seguida, cada um dos olhos foi aberto, formando uma bolsa (saco conjuntival), de maneira que fosse

possível instilar salina (15% EtOH), lidocaína (2%) ou EBEtOH dos órgãos totais de *O. martiana* (2 mg mL⁻¹).

Foi instilado inicialmente 0,5 mL de cada uma das soluções no saco conjuntival e após 30 segundos mais meio mililitro foi aplicado de forma a atingir um volume final de 1 mL.

A seguir, cada um dos olhos foi tocado novamente com fio de nylon por 10 vezes a cada 5 minutos no intervalo de uma hora, contando-se o número de reflexos palpebrais.

3.8.4 Método da Anestesia Intradérmica (adaptado de KUZE RATES et al.,1997)

Cobaias (*Cavia porcellus*), de ambos os sexos (250 a 300 g), em condições controladas de temperatura e iluminação, com livre acesso à água e ração, foram separados e preparados para o bioensaio por meio da tricotomização de pêlos dorsais, 24 h antes do início do experimento (BÜLBRING; WAJDA, 1945).

Para permitir o desaparecimento de qualquer irritação produzida pela tricotomização, os animais foram deixados em repouso (1 dia).

Para corrigir a variação e sensibilidade de diferentes partes da pele raspada e a variação entre animais, volumes equivalentes (0,2 mL) do EBEtOH dos órgãos totais de *O. martiana* (20 mg mL⁻¹), FHex (6 mg mL⁻¹), FClor (10 mg mL⁻¹), FAcOEt (1,5 mg mL⁻¹), FMeOH (5 mg mL⁻¹), lidocaína (2%) e salina (95% em tween 80) foram aplicados via intradérmica (injeção subcutânea), em 3 áreas diferentes (2-3 cm de diâmetro) no dorso de cada animal.

O extrato, as fases e a lidocaína foram solubilizados em salina a 95% em tween 80.

A concentração do extrato bruto etanólico da *Ottonia martiana* empregada neste bioensaio foi baseada nos resultados prévios de rastreamento das doses e DL_{50} e também em estudo anterior de KUZE RATES et al.(1997), que mostrou a produção de um efeito anestésico dose-não-dependente pelo extrato bruto de *Ottonia propinqua*.

As bolhas levantadas pelos volumes injetados (pápulas) foram demarcadas após 5 minutos da aplicação da injeção.

A sensibilidade de cada área demarcada foi obtida pelo número de contrações das cobaias após serem dadas seis picadas leves, randomizadas, em intervalos de 5 minutos num período de 30 minutos.

O escore total (contração) para cada bolha foi adicionado e expresso como um número total de respostas positivas de 36 chances possíveis.

Como a variável avaliada no teste de resposta ao estímulo da picada com agulha não apresentou distribuição normal, foi empregado o teste de KRUSKAL-WALLIS seguido pelo teste de MANN-WHITNEY para as comparações entre os diferentes tratamentos.

Para as comparações entre as medidas realizadas ao longo do tempo foi empregado o teste de FRIEDMAN, seguido pelo teste de WILCOXON. O nível de significância adotado foi de $p \leq 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 EXTRAÇÃO, PARTICIONAMENTO E ISOLAMENTO DE SUBSTÂNCIAS

4.1.1 Extração

Do material vegetal coletado em 2002 (700 g de órgãos totais e 24,5 g de frutos) foram obtidos 180 mL de EBEtOH dos órgãos totais, com concentração de 32,9 mg mL⁻¹. Uma parte do extrato obtido (100 mL) foi reservada para posterior utilização em bioensaios. O volume de extrato restante (80 mL) foi reservado para particionamento com solventes de polaridades crescentes. Também foram obtidos 4,4913 g de resíduo do EBEtOH dos órgãos totais, assim como 50 mL de EBEtOH dos frutos (40,1 mg mL⁻¹).

A coleta de 2003 (470 g de raízes; 3,79 kg de caules; 188,44 g folhas e 30 g de frutos) rendeu 400 mL de EBEtOH das raízes (0,73 g mL⁻¹); 1100 mL de EBEtOH dos caules (0,1161 g mL⁻¹), além de 0,4 mL de óleo essencial (amarelado) das folhas desta espécie vegetal (0,21 % - v/m); 0,1 mL de óleo essencial dos frutos (0,33% - v/m) e 0,1 mL de óleo essencial das raízes (0,02% v/m) de *O. martiana*.

Esses resultados encontram-se na Tabela 4, a seguir.

TABELA 4 – EXTRATOS E ÓLEOS ESSENCIAIS OBTIDOS DA *Ottonia martiana*.

Órgão Vegetal	Droga Vegetal	Volume
Órgãos Totais (coleta 2002) (raiz, caule, folha e fruto)	700,00 g	180 mL EBEtOH (32,9 mg mL ⁻¹)
Frutos (Coleta 2002)	24,50 g	50 mL EBEtOH (40,1 mg mL ⁻¹)
Frutos (Coleta 2003)	30,00 g	0,1 mL de óleo essencial (0,33% - v/m)
Folhas (Coleta 2003)	188,44 g	0,4 mL de óleo essencial (0,21% - v/m)
Caules (Coleta 2003)	3,79 kg	1100 mL EBEtOH (0,11 g mL ⁻¹)
Raízes (coleta 2003)	470,00 g	200 mL EBEtOH (0,73 g mL ⁻¹) 0,1 mL de óleo essencial (0,02% v/m)

4.1.2 Particionamento

Do particionamento do EBEtOH dos órgãos totais (80 mL) foram obtidas FHex (0,8590 g), FClor (0,4250 g), FAcOEt (0,1050 g) e FMeOH (0,5020 g), as quais foram reservadas, para posterior utilização em bioensaios.

Dos frutos de *O. martiana* foram obtidos 4 g de extrato seco etanólico, o qual particionado rendeu 1,5820 g de FFHex; 0,4082 g de FFClor; 0,3555 g de FFAcOEt e 1,6231 g de FFMeOH.

O EBEtOH das raízes obtido após partição líquido-líquido (L/L) com hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol rendeu RFHex (4,0210 g), RFClor (1,1681 g), RFAcOEt (5,0160 g) e RFMeOH (3,0320 g), as quais foram reservadas para isolamento de compostos bioativos.

Na Tabela 5 a seguir, pode-se visualizar os rendimentos de cada fase obtida dos extratos brutos etanólicos (EBEtOH) da *Ottonia martiana*.

TABELA 5 – RENDIMENTO DAS FASES OBTIDAS DOS EXTRATOS BRUTOS ETANÓLICOS (EBEtOH) DA *Ottonia martiana*.

EBEtOH (ano da coleta)	Fase Hexano (FHex)	Fase Clorofórmio (FClor)	Fase Acetato de etila (FAcOEt)	Fase Metanólica (FMeOH)
Órgãos Totais (2002)	0,8590 g	0,4250 g	0,1050 g	0,5020 g
Frutos (2002)	1,5820 g	0,4082 g	0,3555 g	1,6231 g
Raízes (2003)	4,0210 g	1,1681 g	5,0160 g	3,0320 g

A fase que apresentou maior rendimento em cada EBEtOH de *O. martiana* (órgãos totais, frutos e raízes), exibido na Tabela 5 acima, mostra a separação provável dos principais metabólitos secundários desta planta, segundo afinidades (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998):

FHex: esteróides, terpenos e acetofenonas.

FClor: lignanas, flavonóides, lactonas, metoxilados, triterpenos e cumarinas.

FAcOEt: flavonóides, taninos, xantonas, ácidos triterpênicos, saponinas e compostos fenólicos.

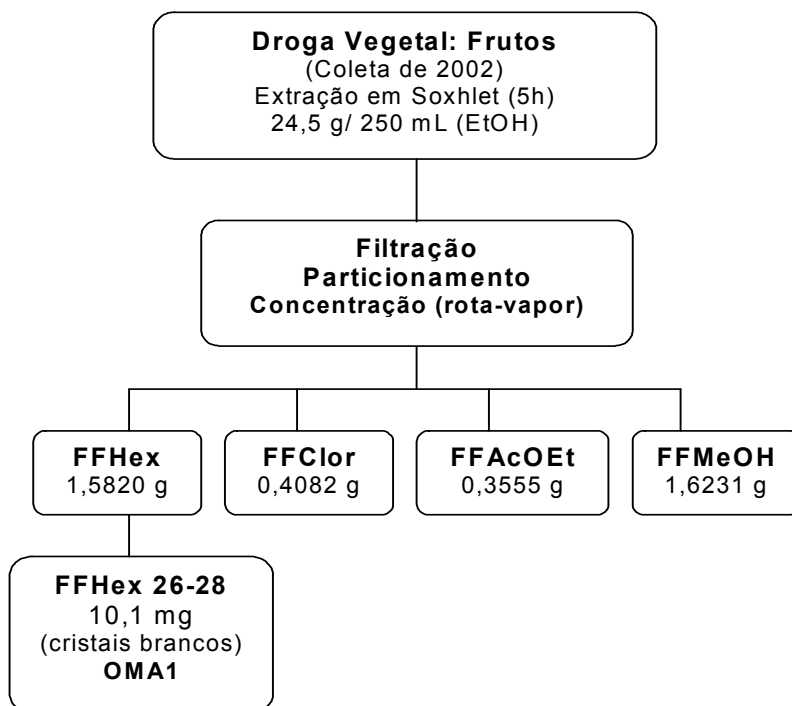
FMeOH: flavonóides glicosilados, taninos, saponinas, carboidratos.

4.1.3 Substâncias e Óleos Essenciais

Dos frutos de *O. martiana* foram isolados 10,1 mg de cristais brancos (**OMA1**), os quais precipitaram das frações reunidas FFHex 26-28 (Figura 27),

após monitoramento por CCD, durante a evaporação lenta do solvente à temperatura ambiente.

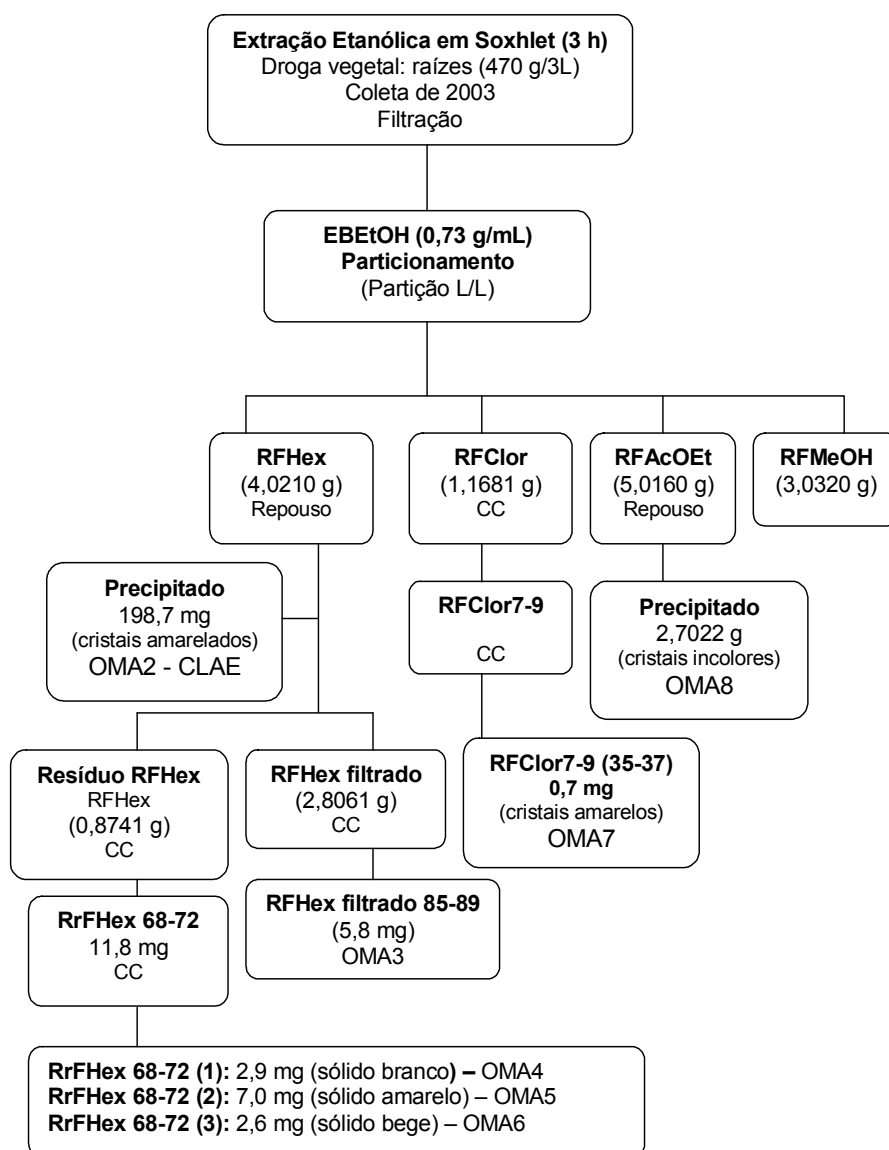
FIGURA 27 – FLUXOGRAMA DA OBTENÇÃO DE OMA1.



Das raízes de *O. martiana* foram isolados 198,7 mg de cristais branco-amarelados-bege (**OMA2**), os quais precipitaram da RFHex deixada em repouso (48 h), em ambiente refrigerado, e separados por filtração à vácuo. De OMA2, após cromatografia preparativa (CLAE), foram obtidos 20,5 mg de **OMA2A**; 1,3 mg de **OMA2B**; 1,9 mg de **OMA2C** e 62,2 mg de **OMA2D**. Foram obtidos 5,8 mg de um sólido branco (**OMA3**) das frações reunidas RFHex filtrado 85-89, após monitoramento por CCD e evaporação lenta do solvente, à temperatura ambiente. Além disso, das frações reunidas RrFHex 68-72 (1), RrFHex 68-72 (2), RrFHex 68-72 (3), após monitoramento por CCD e evaporação lenta do solvente, à temperatura ambiente, foram obtidos 2,9 mg de um sólido branco (**OMA4**), 7 mg

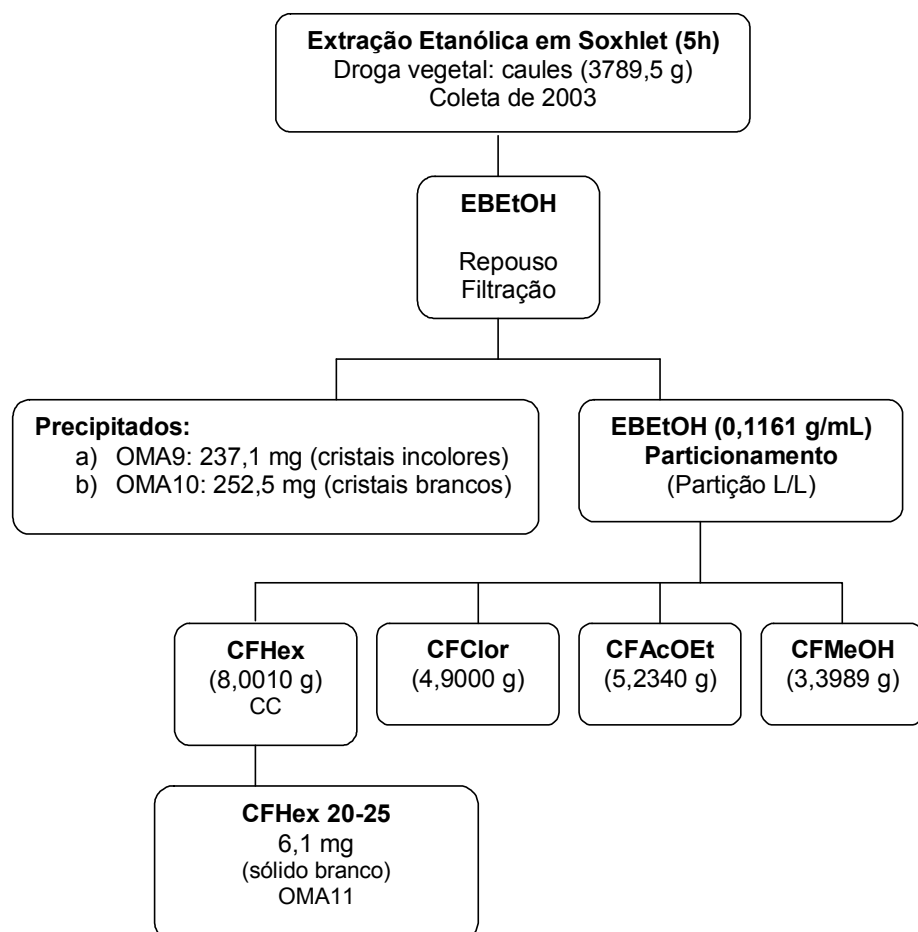
de um sólido amarelo (**OMA5**) e 2,6 mg de um sólido bege (**OMA6**), respectivamente. Da reunião das frações RFClor 7-9(35-37) foi obtido 0,7 mg de cristais amarelos (**OMA7**), os quais precipitaram após a evaporação lenta do solvente, à temperatura ambiente. Também, da RFAcOEt, após repouso em freezer por 48 horas, precipitaram 2,7022 g de cristais incolores (**OMA8**), os quais foram separados por filtração à vácuo (Figura 28).

FIGURA 28 – FLUXOGRAMA DA OBTENÇÃO DE OMA2, OMA3, OMA4, OMA5, OMA6, OMA7 E OMA8.



Dos caules de *O. martiana* foram obtidos 237,1 mg de cristais incolores (**OMA9**) e 2,6152 g de cristais brancos (**OMA10**), os quais precipitaram do EBEtOH deixado em repouso (48 h), em ambiente refrigerado, ao abrigo de luz. Também foram obtidos 6,1 mg de um sólido branco pela reunião das frações CFHex20-25, após monitoramento por CCD e evaporação lenta do solvente (Figura 29).

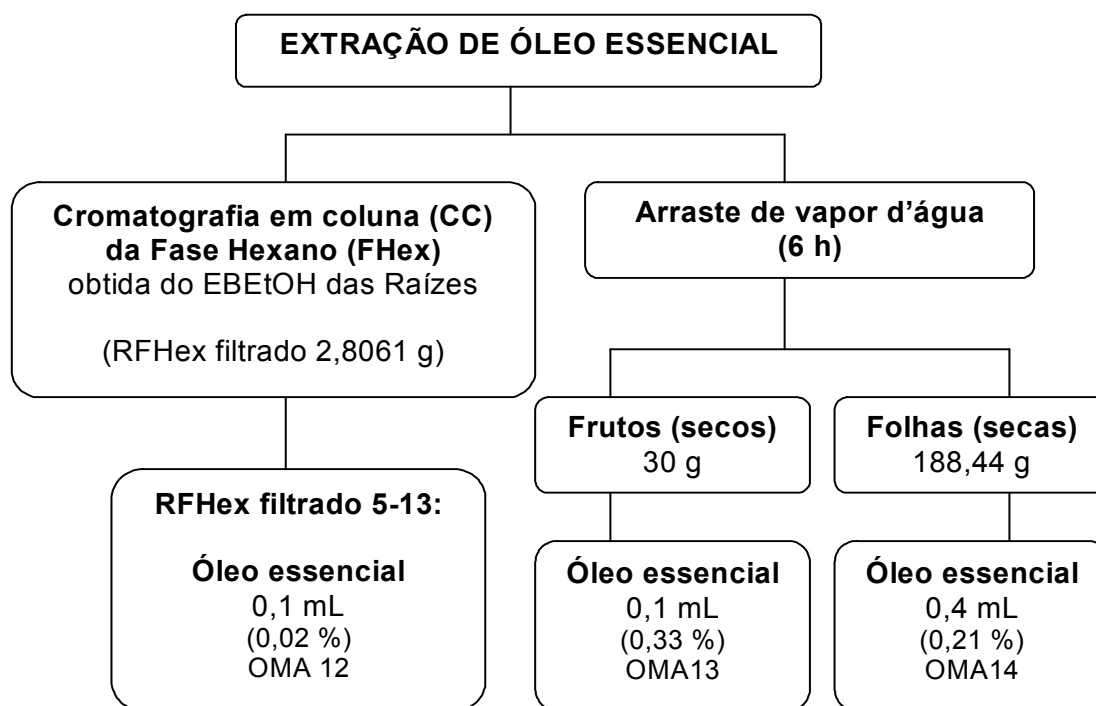
FIGURA 29 – FLUXOGRAMA DA OBTENÇÃO DE OMA9, OMA10 E OMA11.



A reunião das RFHex filtrado 5-13 (Figura 30), após monitoramento por CCD, rendeu 0,1 mL de óleo essencial (**OMA12**).

Também foram obtidos desta espécie vegetal 0,1 mL de óleo essencial dos frutos (**OMA13**) e 0,4 mL de óleo essencial das folhas (**OMA14**).

FIGURA 30 – FLUXOGRAMA DA OBTENÇÃO DE OMA12, OMA13 E OMA14.



As substâncias isoladas das raízes, caules, folhas e frutos de *O. martiana* assim como os óleos essenciais obtidos desta espécie vegetal podem ser visualizados na Tabela 6, a seguir.

TABELA 6 – SUBSTÂNCIAS E ÓLEOS ESSENCIAIS OBTIDOS DE *Ottonia martiana*.

AMOSTRAS	ISOLADOS	m ou v	RENDIMENTO
EBEtOH DOS FRUTOS			
FFHex 26-28 (cristais brancos)	OMA1	Frutos (24,5 g) 10,1 mg	0,04 %
EBEtOH DAS RAÍZES			
RFHex (precipitado): cristais bege	OMA2	198,7 mg	0,04 %
	OMA2.A	20,5 mg	10,32 %
	OMA2.B	1,3 mg	0,65 %
	OMA2.C	1,9 mg	0,96 %
	OMA2.D	62,2 mg	31,30 %
RFHexfilt 85-89: sólido branco	OMA3	5,8 mg	< 0,01 %
RrFHex 68-72(1): cristais brancos	OMA4	2,9 mg	< 0,01 %
RrFHex 68-72(2): sólido amarelo	OMA5	7,0 mg	< 0,01 %
RrFHex 68-72(3): sólido bege	OMA6	2,6 mg	< 0,01 %
RFClor 7-9(35-37)	OMA7	0,7 mg	< 0,01 %
RFAcOEt: cristais brancos	OMA8	2702,2 mg	0,57 %
EBEtOH DOS CAULES			
Precipitado: cristais brancos	OMA9	Caules (3,79 kg) 237,1 mg	< 0,01 %
Precipitado: cristais brancos	OMA10	2615,2 mg	0,07 %
CFHex 20-25: sólido branco	OMA11	6,1 mg	< 0,01 %
ÓLEOS ESSENCIAIS			
RAÍZES (RFHex filtrado 5-13) (CC)	OMA12	0,1 mL	0,02 %
FRUTOS (arraste de vapor d'água)	OMA13	0,1 mL	0,33 %
FOLHAS (arraste de vapor d'água)	OMA14	0,4 mL	0,21 %

m – massa / v – volume

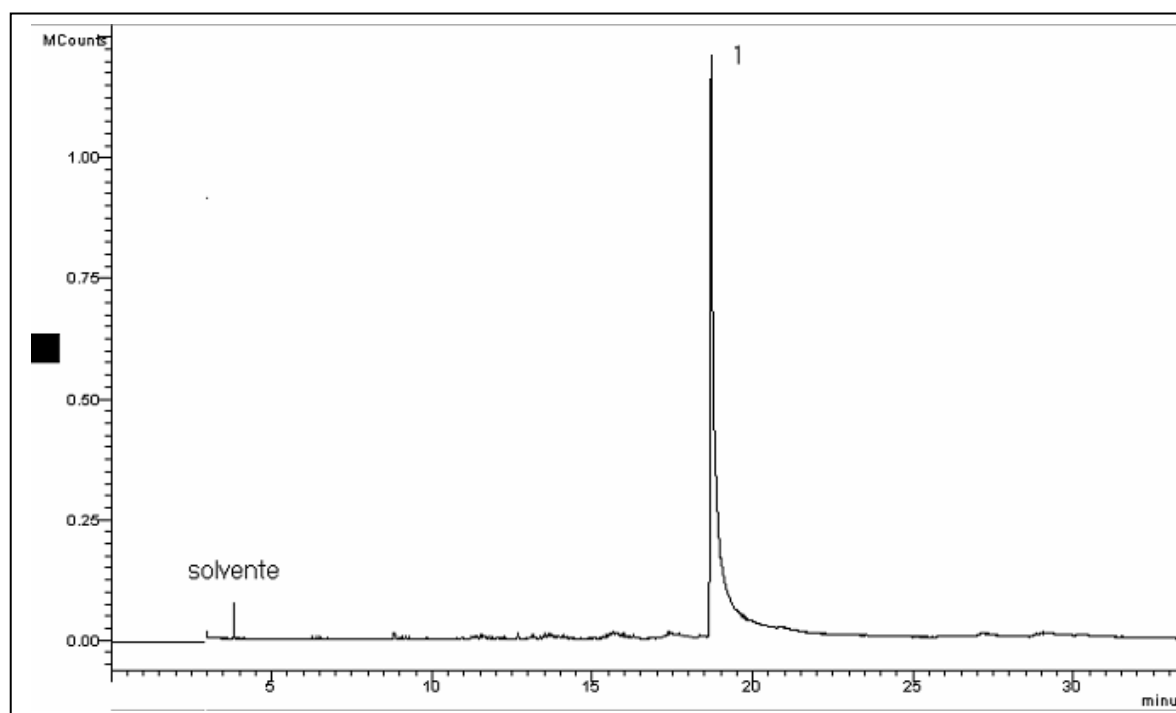
4.2 IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS

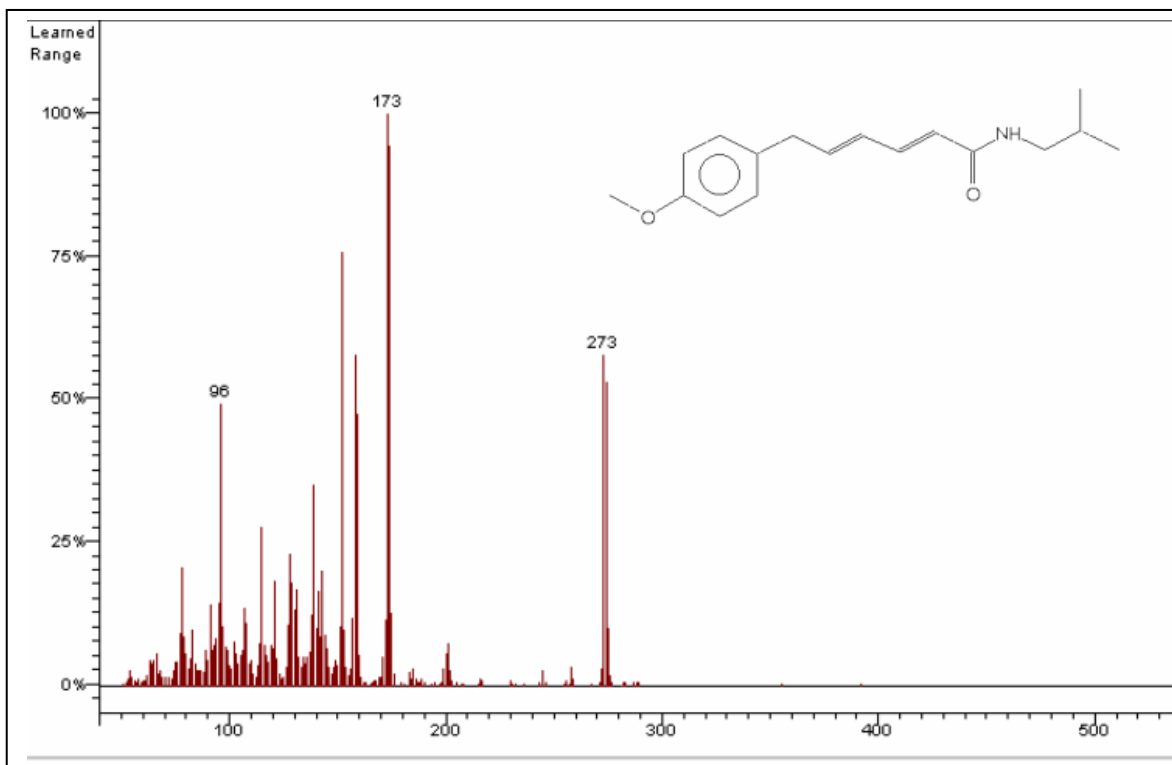
4.2.1 OMA1

O isolado OMA1 foi obtido como cristais brancos, e na análise por CG-EM (condição de análise A) apresentou íon molecular m/z 273 ($[M]^+$, 58 %) e os fragmentos 201 (7 %), 173 (100 %), 159 (48 %), 152 (76 %), 139 (35 %), 121 (18 %), 115 (27 %), 96 (49 %). Os dados dos espectros de massas juntamente com o ponto de fusão (115-119 °C) foram compatíveis com aqueles descritos na literatura para a piperovatina (COSTA; MORS, 1981; CUNICO, 2001; FACUNDO et al., 2004).

O cromatograma e o espectro de massas de OMA1 encontram-se na Figura 31.

FIGURA 31 – CROMATOGRAMA E ESPECTRO DE MASSAS DO ISOLADO OMA1.

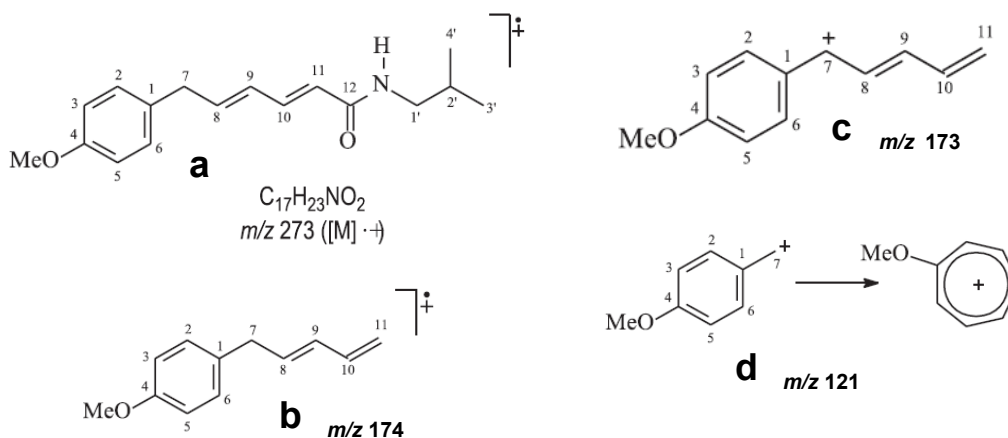




OMA1(1): ($C_{17}H_{23}NO_2$). Cristais brancos. [(2*E*,4*E*)-*N*-isobutil-6-(4-metoxi-fenil)hexa-2,4-dienamida]. Mp 115-119 °C. EM m/z (rel. int): 273 ($[M]^{+}$, 58%), 201 (7%), 173 (100%), 174 (95%), 159 (48%), 152 (76%), 139 (35%), 121 (18%), 115 (27%), 96 (49%).

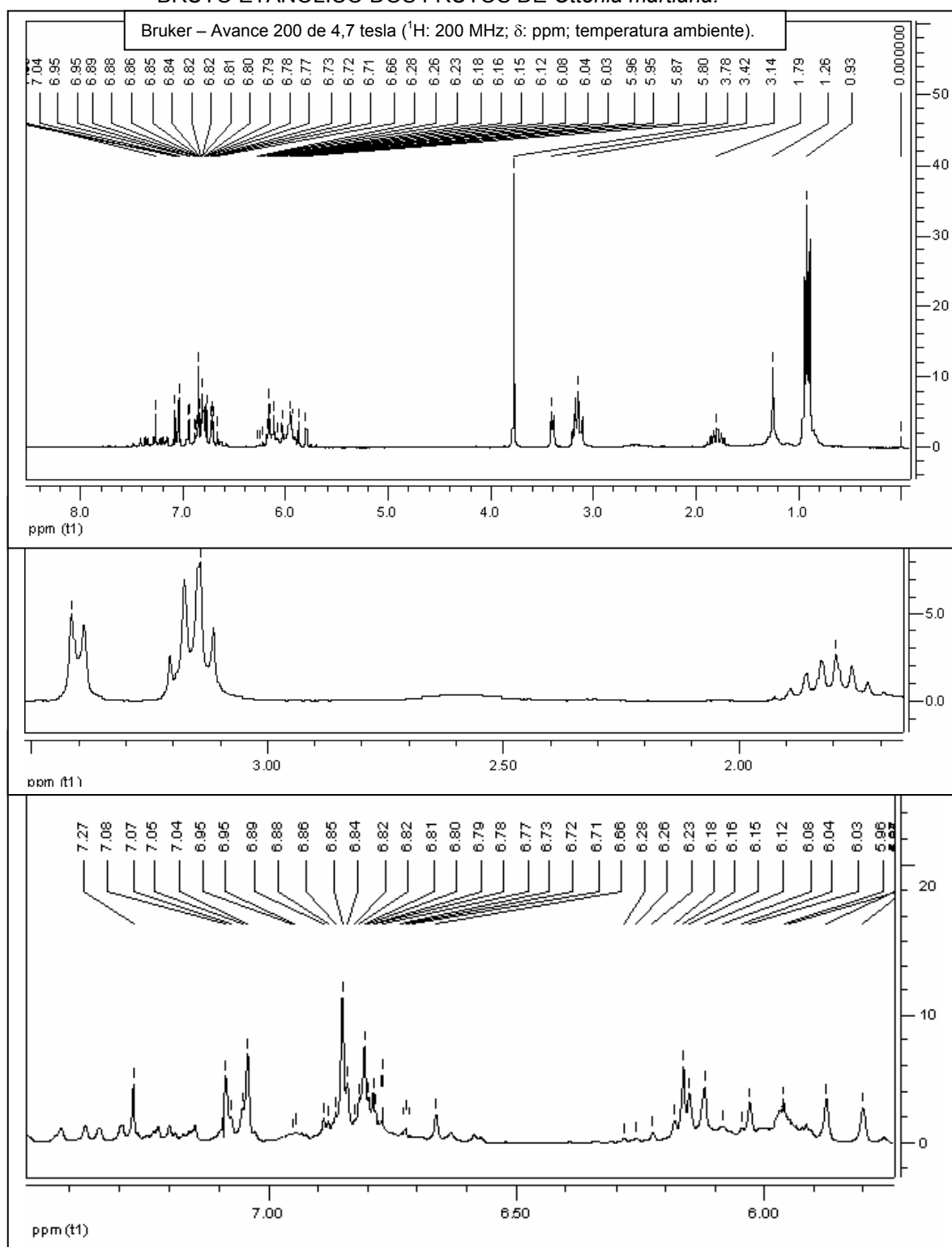
O pico base m/z 173 do espectro de massas de **OMA1**, foi atribuído ao fragmento **c** exibido na Figura 32, a seguir.

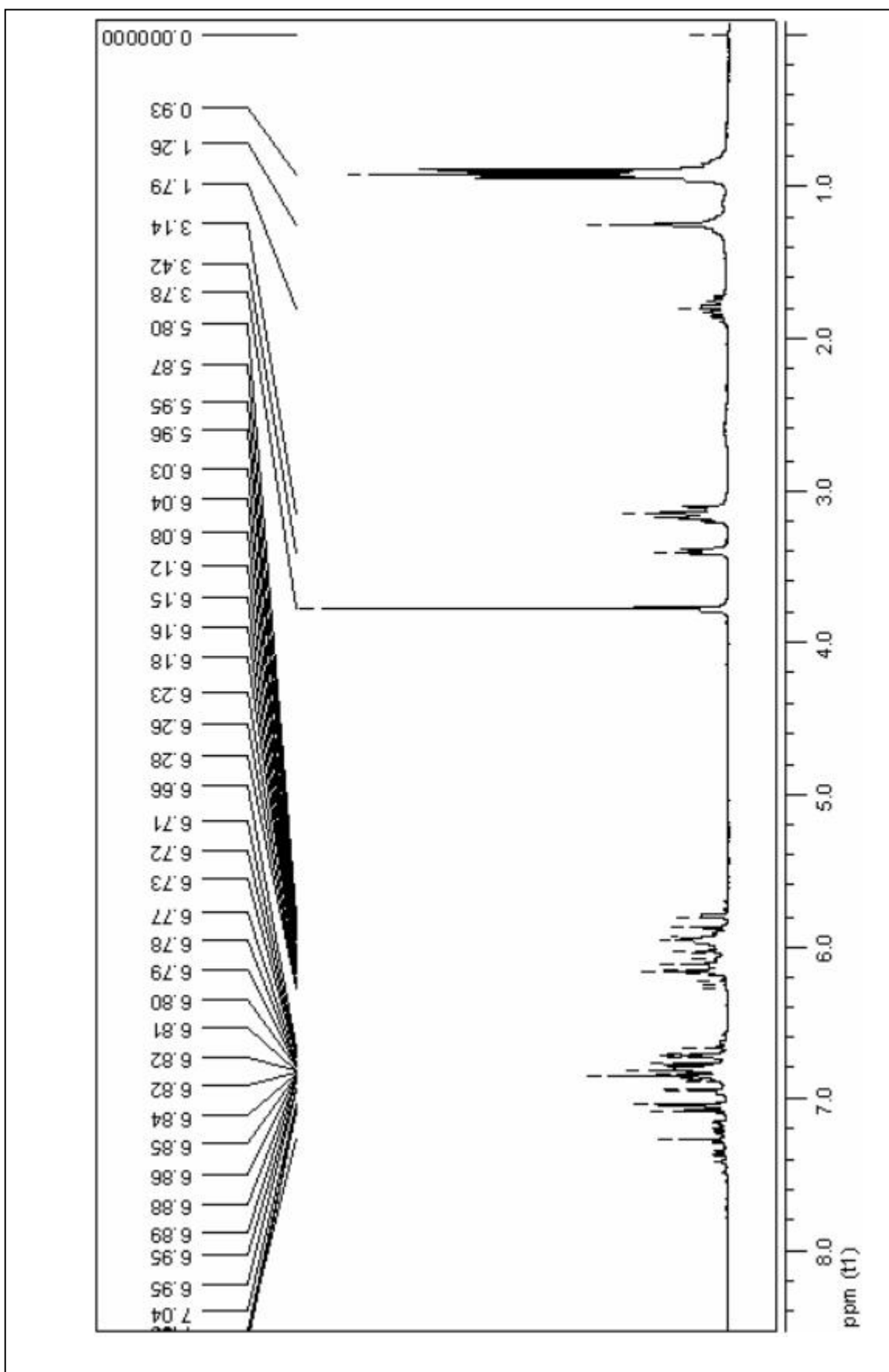
FIGURA 32 - FRAGMENTOS ATRIBUÍDOS AOS PICOS PRINCIPAIS EXIBIDOS NO ESPECTRO DE MASSAS DO ISOLADO OMA1



A estrutura de OMA1 também foi confirmada por meio da análise dos espectros de RMN de ^1H (Figura 33), RMN de ^{13}C e DEPT 135 (Figura 34).

FIGURA 33 – ESPECTROS DE RMN DE ^1H DO ISOLADO OMA1 OBTIDO DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO DOS FRUTOS DE *Ottonia martiana*.





Bruker – Avance 200 de 4,7 tesla (^1H : 200 MHz; δ : ppm; temperatura ambiente).

FIGURA 34 – ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C E DEPT 135 DO ISOLADO OMA1 OBTIDO DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO DOS FRUTOS DE *Ottonia martiana* [Bruker – Avance 200 de 4,7 tesla (^{13}C : 50 MHz; δ : ppm; temperatura ambiente)].

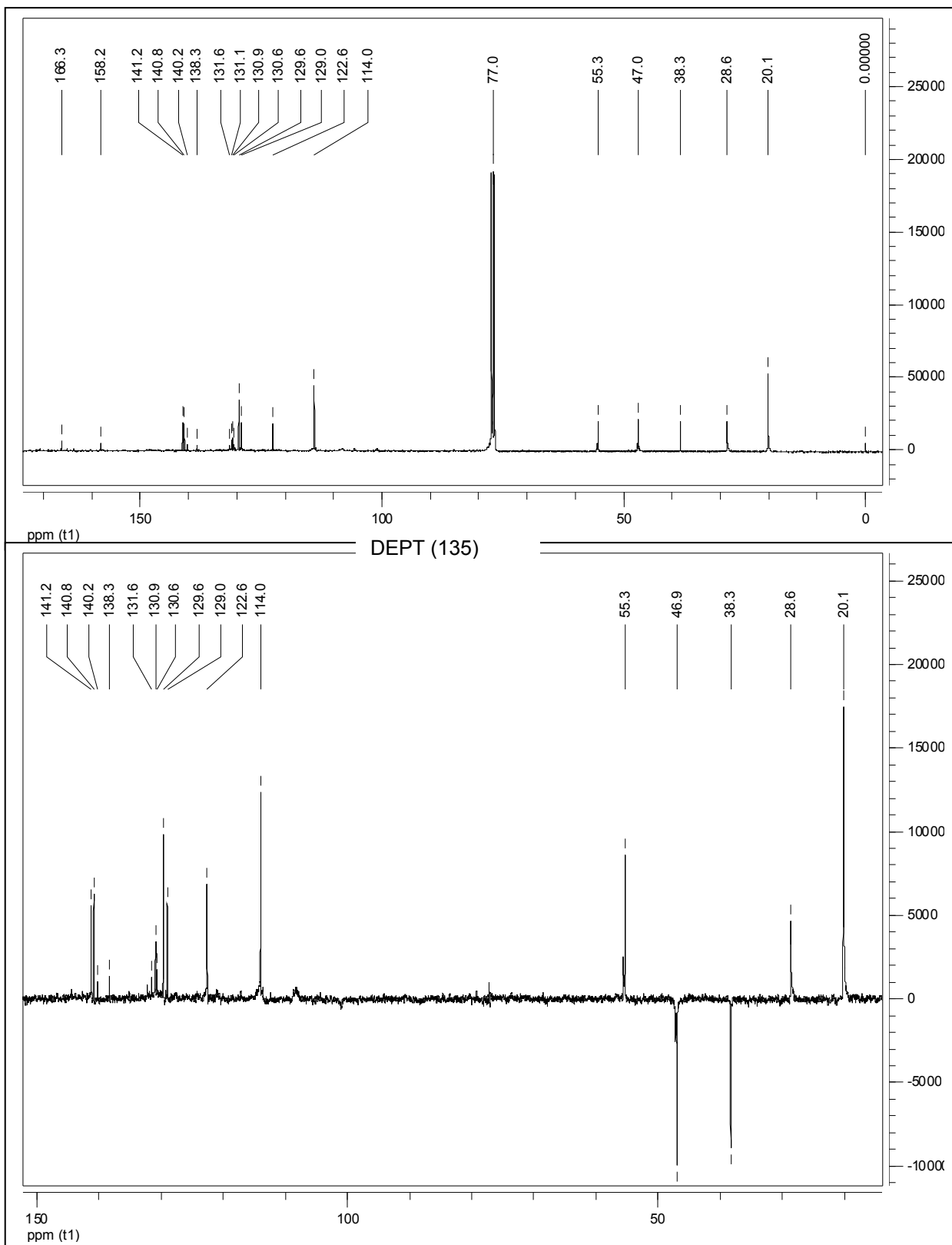
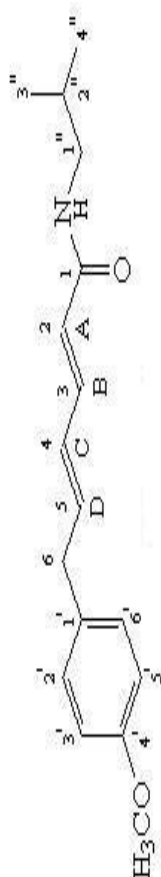


TABELA 7 – RMN- ^{13}C (50 MHz, CDCl_3), DEPT 135 E RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) DE OMA1



OMA1				Piperovatina (MCFERREN; RODRIGUES, 1998)		
Carbono DEPT 135	^{13}C δ (ppm)	^1H δ (ppm)	Multiplicidade (J em Hz)	^{13}C δ (ppm)	^1H δ (ppm)	Multiplicidade (J em Hz)
$\text{C}_{4''}$ (CH_3)	20,1	0,93	<i>d</i> - 3H (6,6)	20,3	0,90	<i>d</i> - 3H (6,7)
$\text{C}_{3''}$ (CH_3)	20,1	0,93	<i>d</i> - 3H (6,6)	20,3	0,90	<i>d</i> - 3H (6,7)
$\text{C}_{2''}$ (CH)	28,6	1,79	<i>m</i> - 1H	28,7	1,78	<i>m</i> - 1H
$\text{C}_{1''}$ (CH_2)	46,9	3,14	<i>dt</i> - 2H (6,4)	47,1	3,13	<i>t</i> - 2H (6,4)
NH , <i>br.</i>	-	5,88	<i>bs</i>	-	5,87	<i>bs</i>
C_1 (q)	166,3	-	-	166,4	-	-
C_2 (CH)	122,6	5,80	<i>d</i> - H_A (14,9)	122,9	5,81	<i>d</i> - H_A (14,9)
C_3 (CH)	141,2	7,20	<i>dd</i> - H_B (15,1)	141,2	7,19	<i>dd</i> - H_B (14,9)
C_4 (CH)	129,0	6,03-6,28	<i>m</i> (H_C)	129,2	6,08-6,20	<i>m</i> (H_C)
C_5 (CH)	140,8	6,03-6,28	<i>m</i> (H_D)	140,8	6,08-6,20	<i>m</i> (H_D)
C_6 (CH_2)	38,3	3,42	<i>d</i> - 2H (5,1)	38,4	3,40	<i>d</i> - 2H (5,4)
$\text{C}_{1'}$ (q)	131,1	-	-	131,2	-	-
$\text{C}_{2'}$ (CH)	129,6	7,04	<i>d</i> - 1H (8,7)	129,7	7,06	<i>d</i> - 1H (8,5)
$\text{C}_{3'}$ (CH)	114,0	6,85	<i>d</i> - 1H (8,6)	114,1	6,83	<i>d</i> - 1H (8,2)
$\text{C}_{4'}$ (q)	158,2	-	-	158,3	-	-
$\text{C}_{5'}$ (CH)	114,0	6,85	<i>d</i> - 1H (8,6)	114,1	6,83	<i>d</i> - 1H (8,2)
$\text{C}_{6'}$ (CH)	129,6	7,04	<i>d</i> - 1H (8,7)	129,7	7,06	<i>d</i> - 1H (8,5)
O- CH_3	55,3	3,78	<i>s</i> - 3H	55,4	3,77	<i>s</i> (3H)

O espectro de RMN de ^1H permitiu evidenciar a posição dos prótons da amida e as constantes de acoplamento dos grupos metil, aromático e dos sistemas de dienos.

O tripleto a 3,14 ppm (2H, t, $J=6,4$) característico do radical $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}$ agrupado e referente aos prótons do $\text{C}_{1''}$, deveria aparecer como um quarteto (J_{CH} -

$\nu_{\text{NH}} = J_{\text{CH}} - \nu_{\text{CH}}$), porém, segundo PINDER e PRICE (1967), os dois sinais se sobrepõem, e estes sob deuteração vão para um dubleto centralizado a 3,12 ppm.

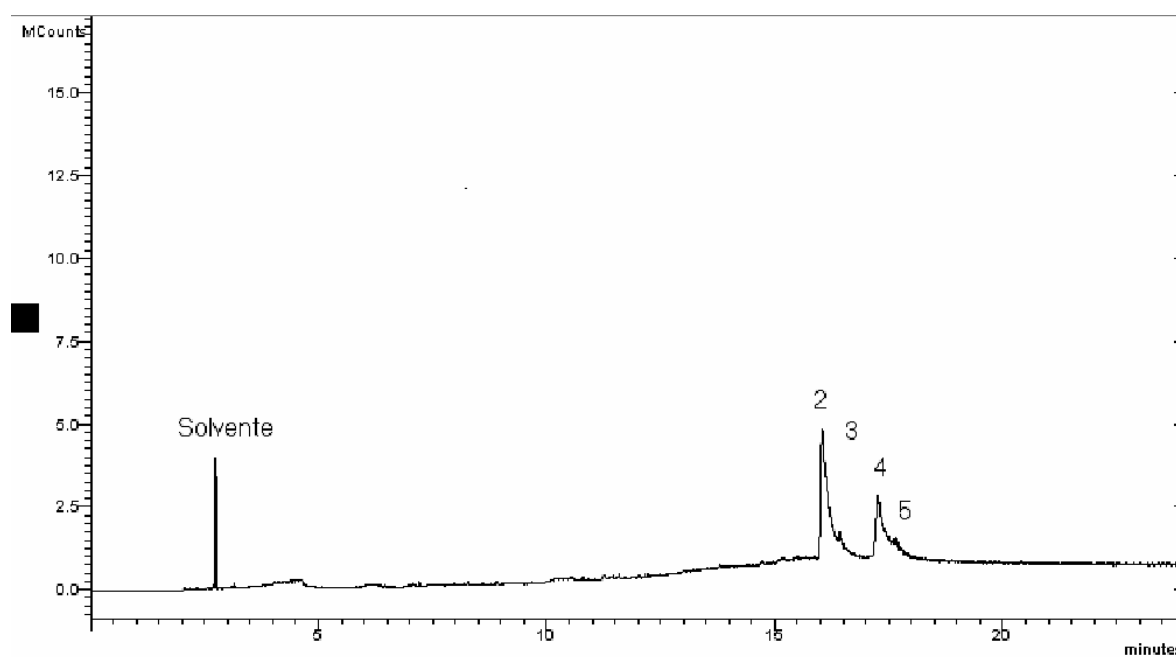
O espectro de RMN de ^{13}C de OMA1 mostrou sinais de anel aromático ρ substituído (131,1; 129,6; 114,0; 158,2 ppm), de insaturações dos sistemas dienos α - β , γ - δ (122,6-141,2 e 129,0-140,8 ppm, respectivamente), assim como de carbonila de amida (166,3 ppm) e de carbono saturado ligado a heteroátomo (nitrogênio) em 46,9 ppm. Além disso, foi exibido um singlete para prótons a 3,78 ppm, característicos da metoxila, a qual foi confirmada pelo espectro de RMN- ^{13}C DEPT- ^{13}C (135) com um sinal para carbono primário a 55,3 ppm. Os sinais a 3,14 e 3,42 ppm, característicos de prótons da porção benzílica e isobutílica, também foram confirmados pelo espectro de RMN- ^{13}C DEPT- ^{13}C (135) com sinais para carbonos secundários a 38,3 e 46,9 ppm, respectivamente. Estes dados comparados com os de literatura (MCFERREN; RODRIGUES, 1998) e associados ao espectro de massas (íon molecular em m/z 273 Da) obtido por meio de CG-EM elucidaram a estrutura e confirmaram a identidade de OMA1, o qual foi denominado de piperovatina.

É importante ressaltar que embora esta amida já tenha sido previamente isolada de raízes e partes aéreas de *O. martiana* (LOPES, 1989; CUNICO et al., 2003a), esta é a primeira vez que se relata o isolamento da mesma exclusivamente dos frutos desta espécie vegetal. Também cabe lembrar que esta amida apresenta notáveis atividades biológicas tais como antimicrobiana (CUNICO et al, 2003a) e piscicida (MCFERREN; RODRIGUES, 1998).

4.2.2 OMA2

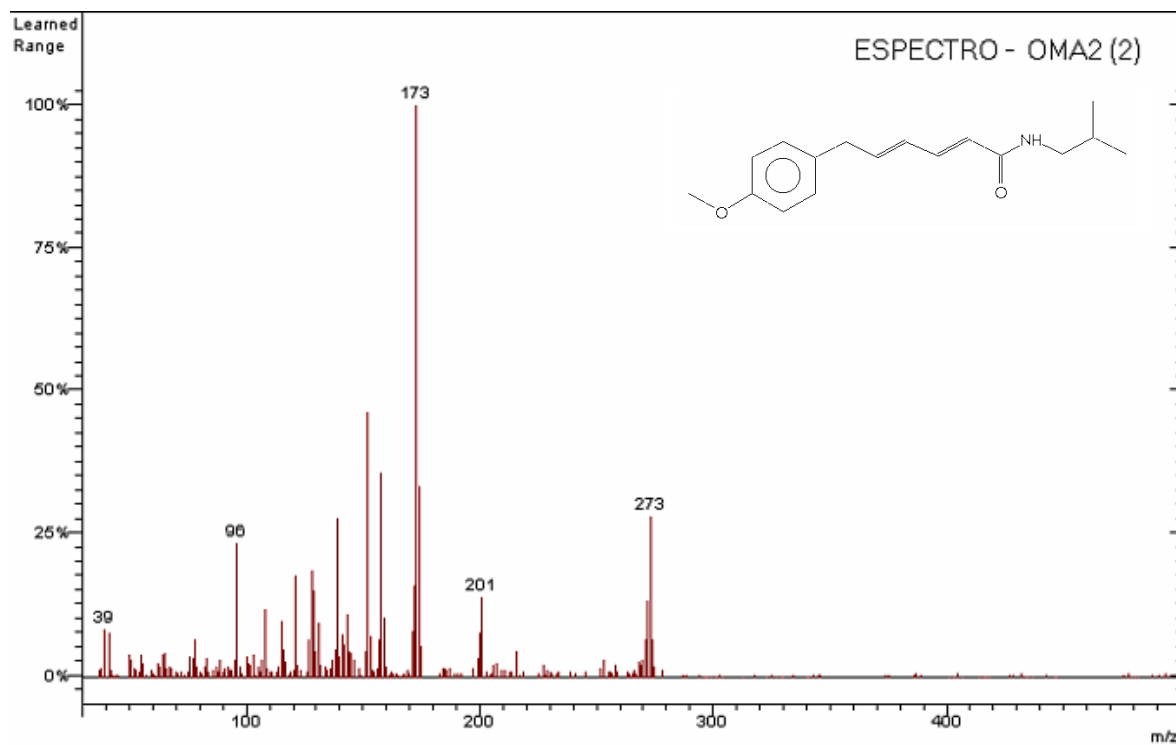
O cromatograma de OMA2 (Figura 35) obtido na análise cromatográfica por CG-EM (condição de análise B), exibiu quatro (4) picos majoritários, indicando tratar-se de uma mistura de 4 substâncias.

FIGURA 35 – CROMATOGRAMA DO ISOLADO OMA2 OBTIDO DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO DAS RAÍZES DE *Ottonia martiana*.

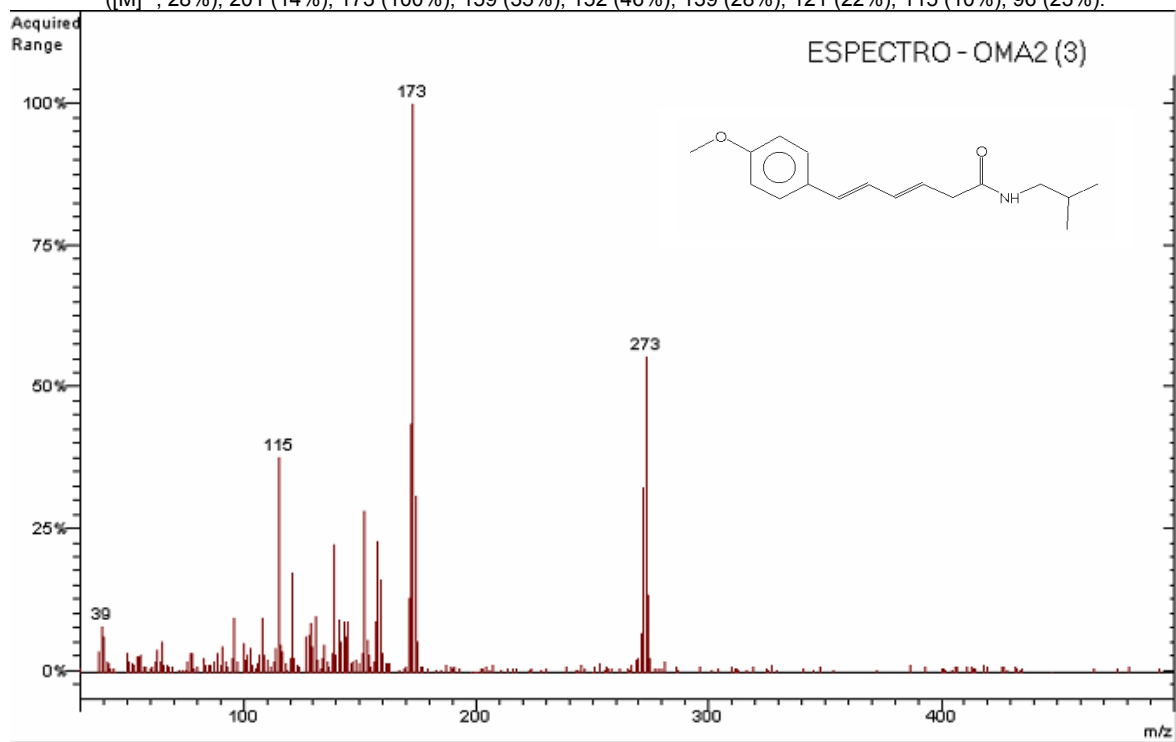


Os espectros de massas dos constituintes (picos 2, 3, 4 e 5) deste isolado encontram-se na Figura 36, a seguir.

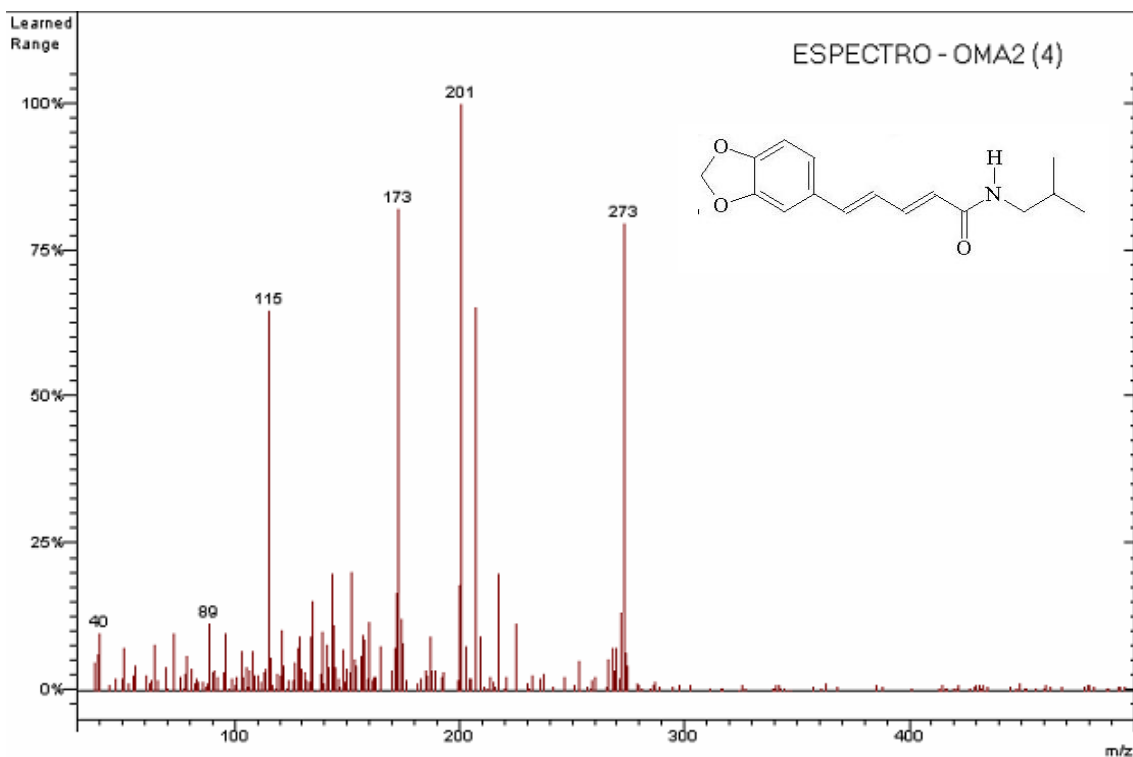
FIGURA 36 – ESPECTROS DE MASSAS DOS CONSTITUINTES (PICOS 2, 3, 4 E 5) DE OMA2 OBTIDO DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO DAS RAÍZES DE *Ottonia martiana*.



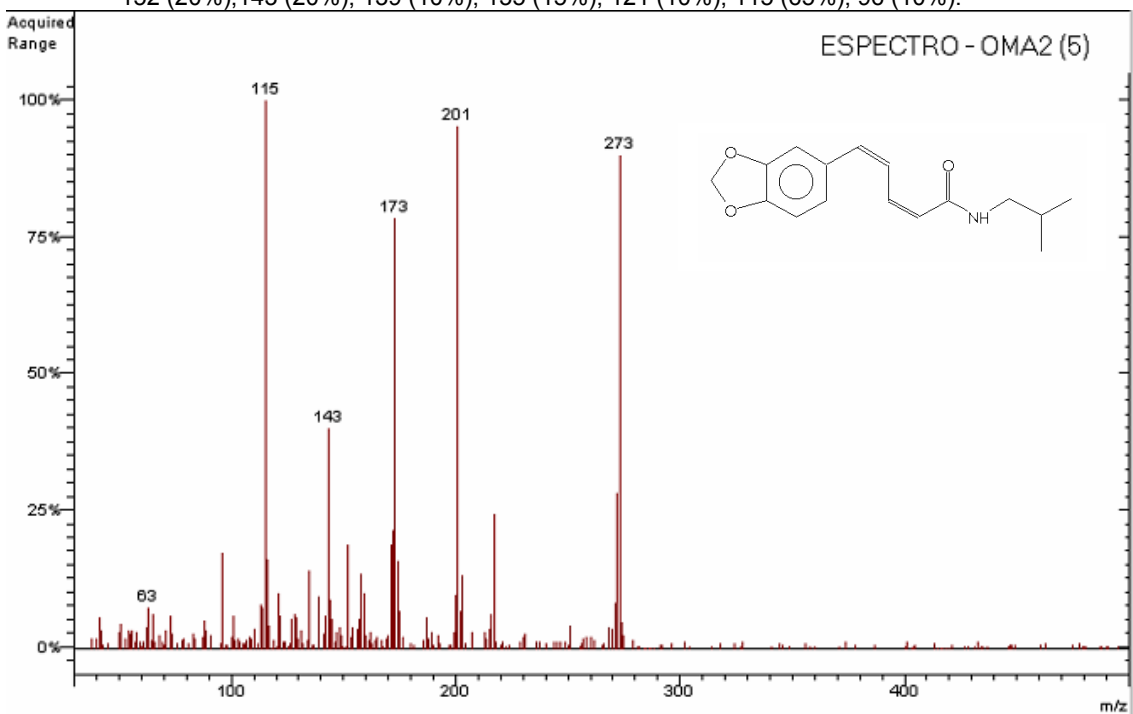
OMA2(2): C₁₇H₂₃NO₂. Cristais brancos. [(2*E*,4*E*)-*N*-isobutil-6-(4-metóxfenil)hexa-2,4-dienamida]. EM *m/z* (rel. int): 273 ([M]⁺, 28%), 201 (14%), 173 (100%), 159 (35%), 152 (46%), 139 (28%), 121 (22%), 115 (10%), 96 (23%).



OMA2(3): C₁₇H₂₃NO₂. Cristais brancos. [(3*E*,5*E*)-*N*-isobutil-6-(4-metóxfenil)hexa-3,5-dienamida]. EM *m/z* (rel. int): 273 ([M]⁺, 55%), 201 (3%), 173 (100%), 159 (24%), 152 (29%), 139 (22%), 121 (18%), 115 (38%), 96 (10%).



OMA2(4): $C_{16}H_{19}NO_3$. Cristais amarelados. [*N*-isobutil-5-(3',4'-metilenodioxifenil)-2-4-penta-dien-amida].
 EM m/z (rel. int): 273 ($[M]^+$, 80%), 216 (21%), 201 (100%), 173 (82%), 172 (17%), 159 (2%), 152 (20%), 143 (20%), 139 (10%), 135 (15%), 121 (10%), 115 (65%), 96 (10%).



OMA2(5): $C_{16}H_{19}O_3N$. Cristais amarelos. [2,4 pentadienamida, 5-(1,3-benzodioxol-5-il)-*N*-(2-metil-propil)-(Z,Z)]. EM m/z (rel. int): 273 ($[M]^+$, 92%), 216 (26%), 201 (97%), 173 (77%), 172 (22%), 159 (20%), 152 (9%), 143 (39%), 139 (3%), 135 (12%), 121 (5%), 115 (100%), 96 (5%).

Pelos dados obtidos na análise por CG-EM verificou-se que o isolado OMA2(2) apresenta íon molecular m/z 273 Da, entre outros, sinais de fragmentos m/z 201(-C₄H₁₁N), 173 (-C₅H₁₁NO) e 96 Da (-C₁₂H₁₈O), os quais foram consistentes com aqueles descritos na literatura para a piperovatina (COSTA; MORS, 1981; CUNICO, 2001; FACUNDO et al., 2004). O isolado OMA2(3) também apresentou íon molecular m/z 273 Da, assim como sinais de fragmentos m/z 173 (-C₅H₁₁NO) e 115 Da (-C₁₁H₁₁O), originados por rupturas no grupamento carbonila e no nitrogênio da amida. Os dados espectrais (CG-EM) revelaram-se consistentes com os descritos na literatura para (3*E*,5*E*)-*N*-isobutil-6-(4-metoxifenil)hexa-3,5-dienamida (PRING, 1982). O espectro de massas do isolado OMA2(4) com íon molecular m/z 273 Da, apresentou sinais de fragmentos m/z 201, 173 e 115 Da originados por rupturas no grupo carbonila e no nitrogênio da amida, assim como outros, os quais mostraram-se consistentes com aqueles descritos na literatura para a piperlonguminina (COSTA; MORS, 1981; SÁEZ et al., 1998; WU et al., 2004). O isolado OMA2(5) também apresentou íon molecular m/z 273 Da, sinais de fragmentos m/z 201 e 173 Da originados por rupturas no grupo carbonila e no nitrogênio da amida, assim como outros, similares aos da isopiperlonguminina, amida descrita como o correspondente isômero *cis,cis* da piperlonguminina (COSTA; MORS, 1981; CUNICO, 2001).

As estruturas destas amidas também foram confirmadas e elucidadas por meio da análise dos espectros de RMN de ¹H e ¹³C obtidos num aparelho Bruker – Avance 200 - 4,7 Tesla (¹H: 200 MHz; ¹³C: 50 MHz), os quais se encontram nas Figuras 37 e 38, a seguir.

FIGURA 37 – ESPECTROS DE RMN DE ^1H DO ISOLADO OMA2 OBTIDO DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO DAS RAÍZES DE *Ottonia martiana* [(Bruker – Avance 200 - 4,7 Tesla (^1H : 200 MHz; δ : ppm; temperatura ambiente)]

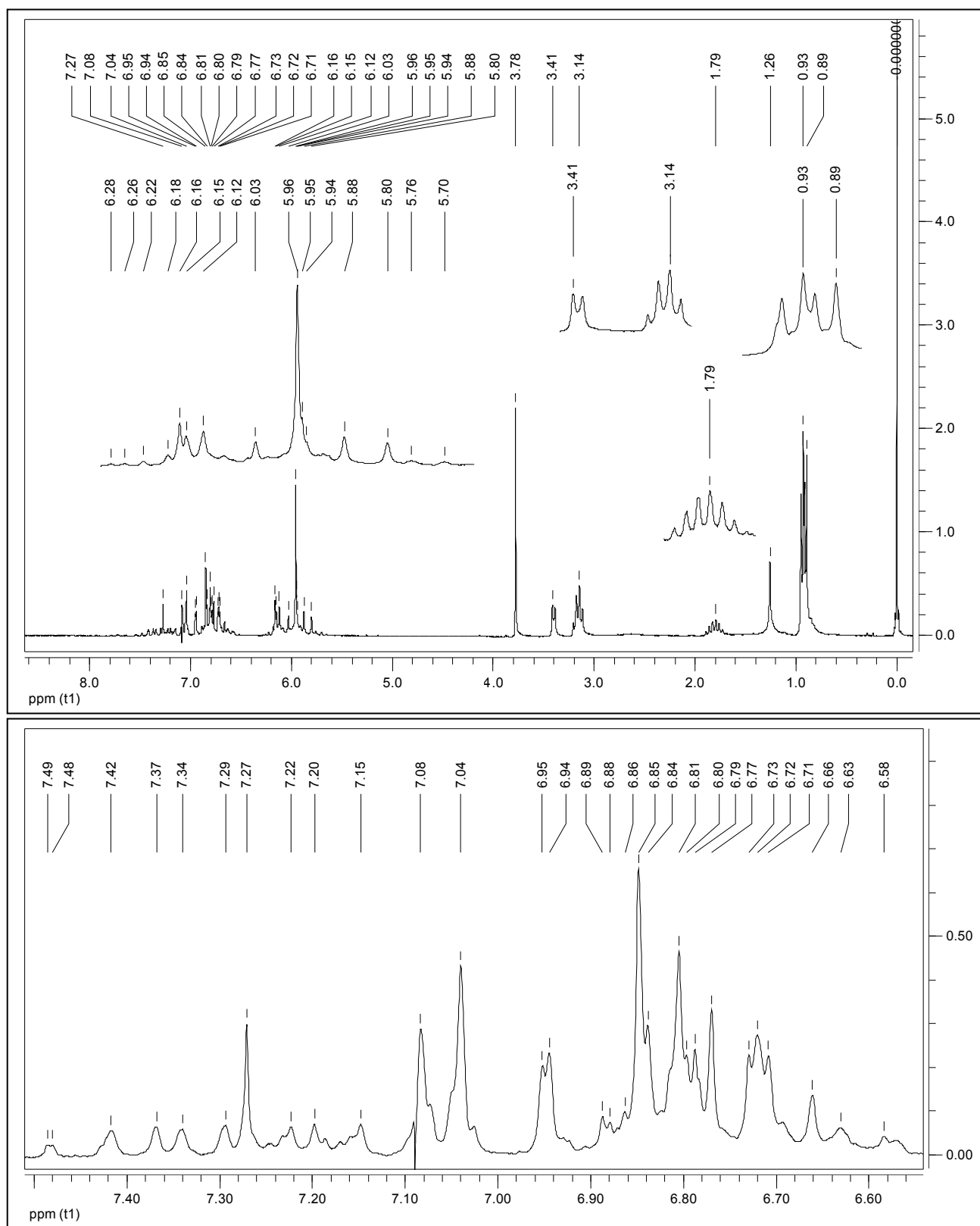
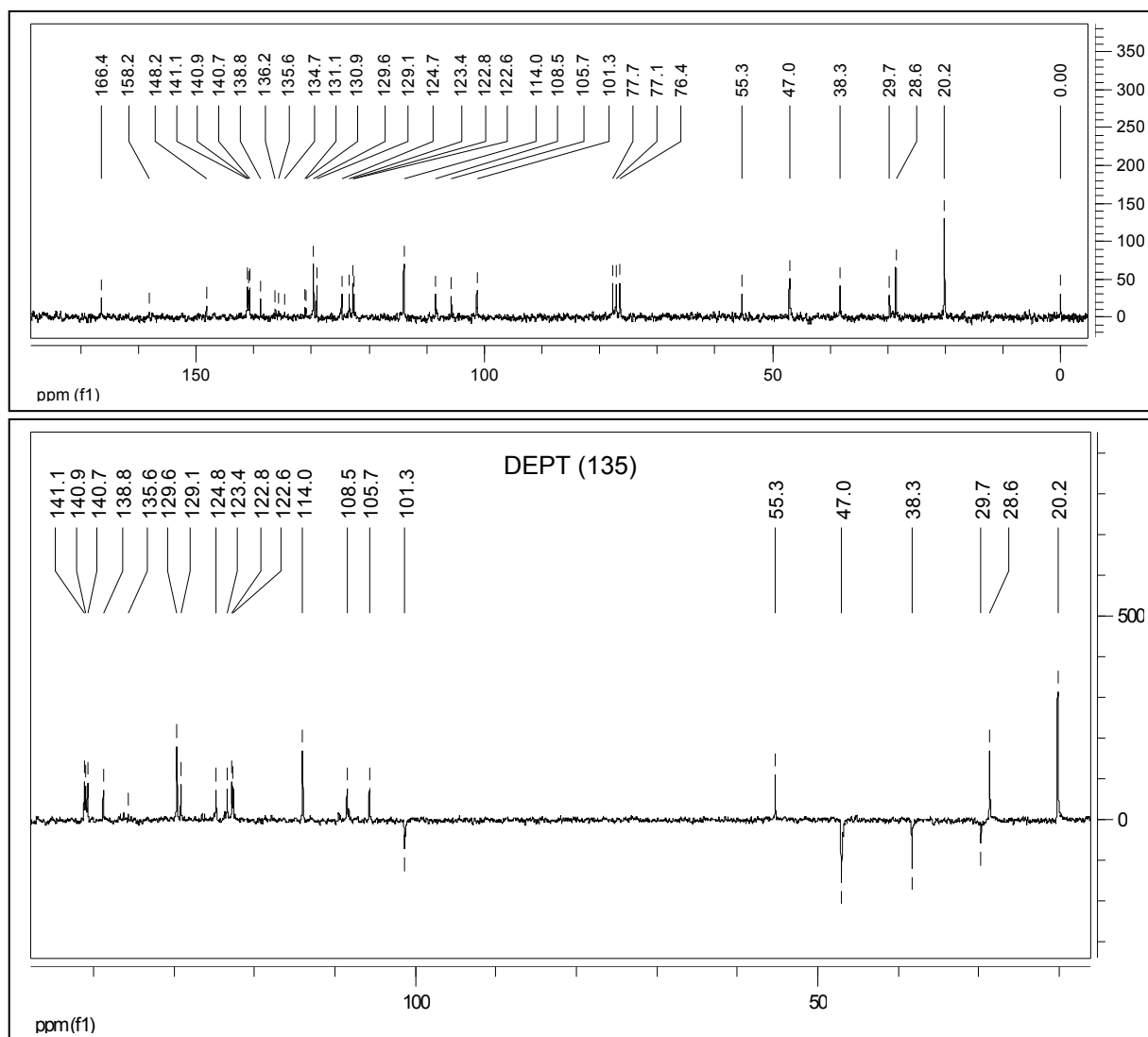


FIGURA 38 – ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C DO ISOLADO OMA2 OBTIDO DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO DAS RAÍZES DE *Ottonia martiana* [Bruker – Avance 200 - 4,7 Tesla (^{13}C : 50 MHz; δ : ppm; temperatura ambiente)].



Estes dados foram organizados numa tabela (Tabela 8), permitindo assim uma melhor visualização para elucidação estrutural dos constituintes deste isolado e comparação dos mesmos com dados da literatura científica.

TABELA 8 - DADOS DE RMN DE ^1H (200 MHz, CDCl_3), RMN DE ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) E DEPT 135 DO ISOLADO OMA2

δ RMN- ^1H (Multiplicidade, J em Hz) - RMN- ^{13}C (ppm) OMA2	DEPT (135)		δ RMN- ^1H (Multiplicidade, J em Hz) - RMN- ^{13}C (ppm) (2) PIPEROVATINA (MCFERREN; RODRIGUES, 1998)	δ RMN- ^1H (Multiplicidade, J em Hz) (PRING, 1982) - RMN- ^{13}C (ppm) (3) (NMR PREDICT ACD ^{13}C)	δ RMN- ^1H (Multiplicidade, J em Hz) - RMN- ^{13}C (ppm) (4) PIPERLONGUMININA (WU et al., 2004)	δ RMN- ^1H (Multiplicidade, J em Hz) - RMN- ^{13}C (ppm) (5) ISOPIPERLONGUMININA (CUNICO, 2001)
0,93 (3H, <i>dd</i> - 6,66) - 20,2	CH_3	C_4''	0,90 (3H, <i>d</i> - 6,71) - 20,3	0,88 (3H, <i>d</i> - 6,71) - 20,3	0,93 (3H, <i>d</i> - 6,70) - 20,1	0,94 (3H, <i>d</i> - 7,0) - 20,1
0,93 (3H, <i>dd</i> - 6,66) - 20,2	CH_3	C_3''	0,90 (3H, <i>d</i> - 6,71) - 20,3	0,88 (3H, <i>d</i> - 6,71) - 20,3	0,93 (3H, <i>d</i> - 6,70) - 20,1	0,94 (3H, <i>d</i> - 7,0) - 20,1
1,79 (1H, <i>m</i> - 6,6) - 28,6	CH	C_2''	1,78 (1H, <i>m</i> - 6,71) / 28,7	1,78 (1H, <i>m</i> - 6,71) / 28,7	1,82 (1H, <i>m</i>) / 28,6	1,83 (1H, <i>m</i>) / 28,6
3,14 (2H, <i>dd</i> - 6,46) - 47,0	CH_2	C_1''	3,13 (2H, <i>t</i> - 6,40) - 47,1	3,13 (2H, <i>t</i> - 6,40) - 47,1	3,90 (2H, <i>dd</i> , <i>t</i> - 6,48) - 47,0	3,17 (2H, <i>dd</i> , <i>t</i> - 7,0) - 46,7
5,88 (<i>bs</i>) -		NH	5,87 (<i>bs</i>) -	5,87 (<i>bs</i>) -	5,67 -	5,65 -
q - 166,4	q	C_1	166,4 q	166,4 q	166,1 q	166,3 q
5,96 (<i>d</i> - 14,6) - 122,6 5,88 (<i>d</i> - 14,4) - 122,8 5,76 (<i>dt</i> - 11,4) - 123,4 3,41 (<i>d</i> - 5,5) - 29,7	CH / CH_2	C_2	5,81 (<i>d</i> - 14,9) - 122,9	3,40 (<i>d</i> - 5,49) - 29,7	5,91 (1H, <i>d</i> - 14,74) - 122,6	5,68 (1H, <i>d</i> - 11,4) - 123,6
7,20 (<i>dd</i> - 15,0; 9,41) - 141,1 7,36 (<i>dd</i> - 15,0; 9,41) - 140,9 7,49 (<i>dd</i> - 11,4) - 136,2 5,76 (<i>dt</i> - 11,4) - 136,2	CH	C_3	7,19 (<i>dd</i> - 14,9; 9,51) - 141,2	5,76 (<i>dd</i> - 11,4) - 136,2	7,36 (1H, <i>m</i>) - 141,0	7,47 (1H, <i>t</i> - 11,4) - 136,2
6,12 - 6,22 (<i>m</i>) - 129,1 6,18 (<i>dd</i> - 14,9) - 130,9 6,72 (<i>t</i> - 11,8) - 124,8 6,89 (<i>t</i> - 11,5) - 122,6	CH	C_4	6,08-6,20 (<i>m</i>) - 129,2	6,18 (<i>dd</i> - 14,9) - 130,9	6,67 (1H, <i>m</i>) - 124,6	6,87 (1H, <i>t</i> - 11,4) - 122,2
6,12-6,22 (<i>m</i>) - 140,9 6,72 (<i>dd</i> - 11,5) - 135,6 6,81 (<i>m</i>) - 138,8 6,89 (<i>m</i>) - 129,1	CH	C_5	6,08-6,20 (<i>m</i>) - 140,8	6,73 (<i>m</i>) - 129,1	6,77 (1H, <i>m</i>) - 138,8	6,68 (1H, <i>d</i> - 11,4) - 135,6
3,41 (<i>d</i> - 5,08) - 38,3 6,58 (<i>dd</i> - 15,08; 10,8) - 140,9	CH_2 / CH	C_6	3,40 (<i>d</i> - 5,49) - 38,4	6,56 (<i>m</i>) - 140,9	-	-
q - 131,2 q - 130,9	q	C_1'	q - 131,2	q - 131,2	q - 130,9	q - 130,7
7,04 (<i>d</i> - 8,68) - 129,6 6,94 (<i>d</i> - 1,45) - 105,7	CH	C_2'	7,06 (<i>d</i> - 8,54) - 129,7	7,09 (<i>d</i>) - 129,7	6,97 (1H, <i>d</i> - 1,35) - 105,7	6,96 (1H, <i>d</i> - 1,35) - 105,7
6,85 (<i>d</i> - 8,67) - 114,0 q - 148,2	CH / q	C_3'	6,83 (<i>d</i> - 8,24) - 114,1	7,09 (<i>d</i>) - 114,1	q - 148,2	q - 148,2
q - 158,3 q - 148,2	q	C_4'	q - 158,3	q - 158,3	q - 148,2	q - 148,2
6,81 (<i>d</i> - 8,42) - 108,5 6,85 (<i>d</i> - 8,67) - 114,0	CH	C_5'	6,83 (<i>d</i> - 8,24) - 114,1	7,09 (<i>d</i>) - 114,1	6,76 (1H, <i>d</i> - 8,03) - 108,5	6,76 (1H, <i>d</i> - 8,01) - 108,1
6,88 (<i>dd</i> - 8,42; 1,58) - 123,4 6,88 (<i>dd</i> - 8,42; 1,58) - 124,8 7,04 (<i>d</i> - 8,68) - 129,6	CH	C_6'	7,06 (<i>d</i> - 8,54) - 129,7	7,09 (<i>d</i>) - 129,7	6,88 (1H, <i>dd</i> - 1,34; 8,03) - 123,2	6,87 (1H, <i>dd</i> - 1,34; 8,03) - 124,8
3,78 (<i>s</i>) - 55,3	CH_3	OCH_3	3,77 (<i>s</i>) - 55,4	3,80 (<i>s</i>) - 55,4	-	-
5,96 (<i>s</i>) - 101,3	CH_2	OCH_2O	-	-	5,97 (2H, <i>s</i>) - 101,3	5,96 (2H, <i>s</i>) - 101,3

s - *singlete*; d - *dublete*; t - *tripleto*; m - *multiplero*; q - *carbono quartenário*

2: piperovatina / 3: (3*E*,5*E*)-*N*-isobutil-6-(4-metoxifenil)hexa-3,5-dienamida / 4: piperlonguminina / 5: isopiperlonguminina.

A análise no aparelho de 200 MHz foi capaz de revelar a posição dos prótons das amidas e as constantes de acoplamento dos grupos metil, aromático e dos sistemas de dienos.

No espectro exibido por OMA2, o tripleto a 3,14 ppm (2H, *t*, $J=6,46$), que é específico para um radical $\text{-NH-CH}_2\text{-CH}$ agrupado e referente aos prótons do $\text{C}_{1''}$, deveria aparecer como um quarteto ($J_{\text{CH-NH}} = J_{\text{CH-CH}}$). Segundo PINDER e PRICE (1967), os dois sinais se sobrepõem, e estes sob deuteração vão para um dubleto centralizado a 3,12 ppm.

O espectro de RMN de ^{13}C de OMA2 mostra sinais de anel aromático ρ substituído (131,2; 129,6; 114,0; 158,3 ppm), de insaturações dos sistemas dienos $\alpha\text{-}\beta$, $\gamma\text{-}\delta$ (122,8-141,1 e 129,1-140,9 ppm, respectivamente), assim como de carbonila de amida (166,4 ppm) e de carbono saturado ligado a heteroátomo (nitrogênio) em 47,0 ppm. Além disso, foi exibido um singlete para prótons a 3,78 ppm, característicos da metoxila, a qual foi confirmada pelo espectro de RMN- ^{13}C DEPT- ^{13}C (135) com um sinal para carbono primário a 55,3 ppm. Os sinais a 3,14 e 3,41 ppm, característicos de prótons das porções isobutílica e benzílica, também foram confirmados pelo espectro de RMN- ^{13}C DEPT- ^{13}C (135) com sinais para carbonos secundários a 47,0 e 38,3 ppm, respectivamente. Estes dados corroboraram com os descritos para o isolado OMA1, os quais, associados aos espectros de massas obtidos por CG-EM e dados da literatura para a piperovatina, revelaram a identidade de OMA2(2).

Além desses, o espectro de RMN de ^{13}C de OMA2 mostra sinais de insaturações dos sistemas dienos $\alpha\text{-}\beta$, $\gamma\text{-}\delta$ (136,2-130,9 e 129,1-140,9 ppm,

respectivamente), assim como de um sinal a 29,7 ppm, o qual pelo espectro de RMN-¹³C DEPT-¹³C (135) foi confirmado como um sinal para carbono secundário ligado à carbonila da amida. Estes dados associados àqueles obtidos por CG-EM e de literatura permitiram elucidar a estrutura química de OMA2(3) denominada de (3*E*,5*E*)-*N*-isobutil-6-(4-metóxfenil)hexa-3,5-dienamida, amida previamente isolada por DUSTAN e GARNETT (1895).

O espectro de RMN-¹H de OMA2 também revelou sinais para 4 prótons olefínicos a 5,96 e 7,36 ppm atribuídos aos prótons H-2 e H-3 de um sistema carbonila α - β insaturado e dos prótons a 6,72 e 6,81 ppm dos hidrogênios H-4 e H-5 que acoplam na posição *trans* da segunda dupla ligação conjugada com a primeira. Observou-se um singlete para os prótons a 5,96 ppm, característico do grupo metilenodioxílico, grupo que é confirmado pelo espectro de RMN-¹³C DEPT-¹³C (135) com um sinal para carbono secundário a 101,3 ppm. A região entre 7,36 ppm e 6,81 ppm apresentou os seguintes sinais: dubleto a 6,94 ppm ($J=1,45$ Hz), duplo dubleto a 6,88 ppm ($J = 8,42$ Hz, $J' = 1,58$ Hz) e dubleto a 6,81 ppm ($J = 8,42$ Hz). Estes dados (OMA2.4) correspondem à conhecida amida piperlonguminina {*N*-isobutil-5-(3',4'-metilendioxifenil)-2-4-pentadienamida}, a qual foi isolada pela primeira vez de *Piper longum* (SÁEZ et al, 1998; WU et al., 2004).

Em contrapartida, foram observados sinais para 4 prótons olefínicos, sendo dois sinais a 5,76 e 7,49 ppm atribuídos aos prótons H-2 e H-3 de um sistema carbonila α - β insaturado e dos prótons a 6,89 e 6,72 ppm dos hidrogênios H-4, H-5 que acoplam na posição *cis* da segunda dupla ligação conjugada com a primeira. Dúvidas sobre as indicações precisas para os prótons do C₃ e C₄ foram

dispensadas, pois os sinais apresentados no espectro de RMN- ^1H foram consistentes com os apresentados por COSTA e MORS (1981), os quais utilizaram a técnica "spin tickling" (dupla irradiação), para elucidar as diferenças observadas entre os espectros dos isômeros piperlonguminina e isopiperlonguminina, em relação aos prótons β para o grupo carbonila da amida. Estes dados associados aos de literatura e aos da análise por CG-EM permitiram concluir que OMA2(5) corresponde à conhecida isobutilamida isopiperlonguminina [2,4 pentadienamida, 5-(1,3-benzodioxol-5-il)-*N*-(2-metil-propil)-(Z,Z)]. a qual foi isolada pela primeira vez da espécie *O. corcovadensis*, por COSTA e MORS (1981).

É importante esclarecer que as pequenas diferenças verificadas para estes compostos encontram-se na faixa do erro experimental, apesar das cadeias laterais pouco diferenciáveis por RMN de ^1H e ^{13}C . Também, cabe ressaltar que embora estas amidas já tenham sido previamente isoladas de espécies de Piperaceae, esta é a primeira vez que se registra a precipitação de uma mistura de cristais de amidas a partir de um extrato de *O. martiana* deixado em repouso sob refrigeração, após ser obtido por extração (à quente) em um Soxhlet modificado.

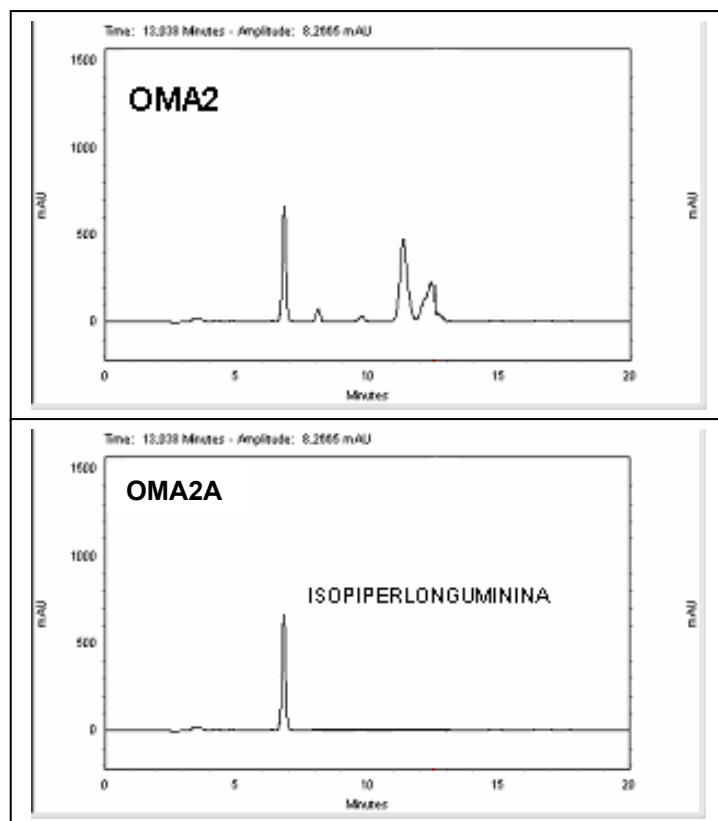
4.2.2.1 OMA2A, OMA2B, OMA2C e OMA2D

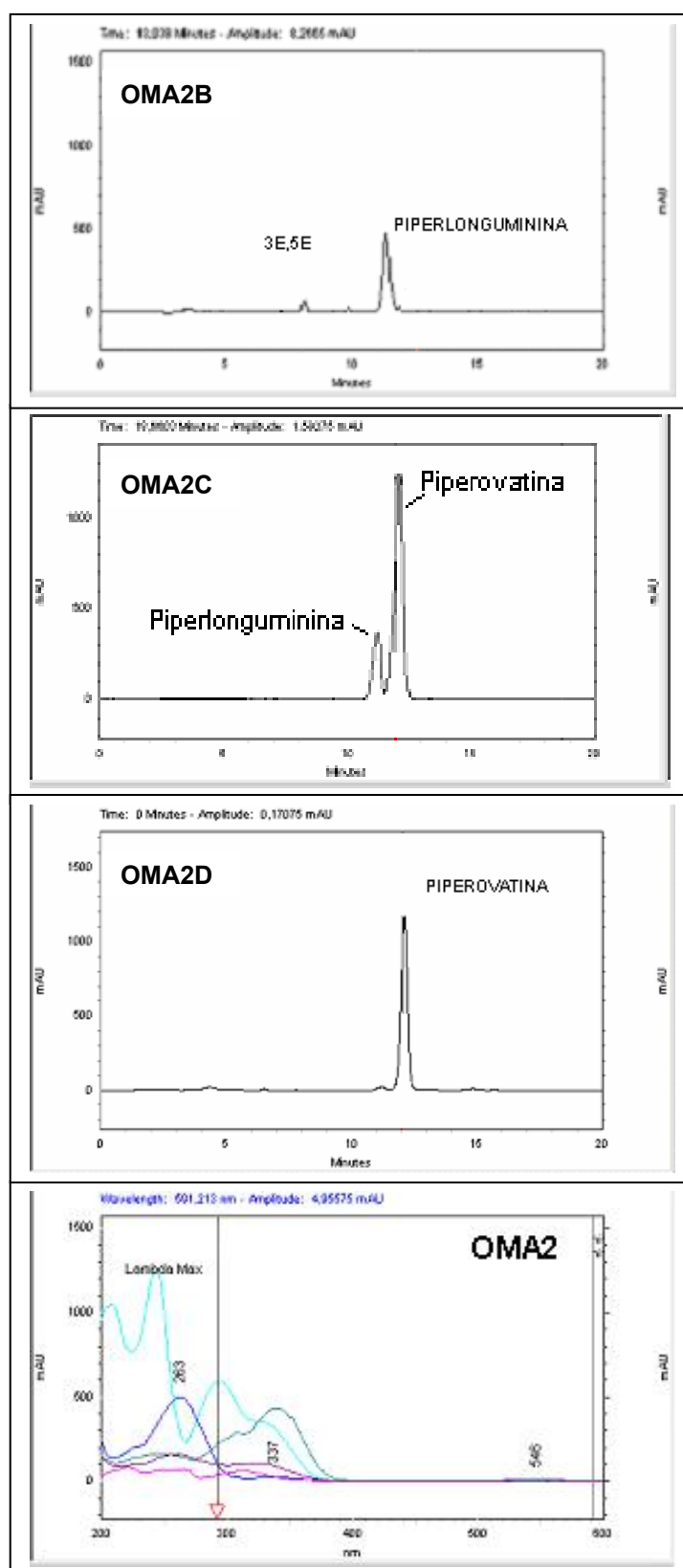
Após cromatografia preparativa de OMA2 por CLAE foram obtidos os isolados OMA2A (20,5 mg), OMA2B (1,3 mg), OMA2C (1,9 mg) e OMA2D (62,2

mg). As análises por CG-EM, CLAE, comparação com dados de literatura e de amostras autênticas permitiram identificar OMA2A como isopiperlonguminina, OMA2B como uma mistura de (3*E*,5*E*)-*N*-isobutil-6-(4-metoxifenil)hexa-3,5-dienamida com piperlonguminina, OMA2C como uma mistura de piperlonguminina com piperovatina e OMA2D como piperovatina. Os dados obtidos na análise por CG-EM foram similares aos descritos anteriormente para OMA2, sendo importante lembrar que estas amidas apresentam notáveis atividades biológicas tais como antimicrobiana, antiinflamatória, inseticida, piscicida, sialagoga, entre outras (CUNICO et al., 2004).

Os respectivos cromatogramas e espectros de UV obtidos na análise por CLAE encontram-se na Figura 39, a seguir.

FIGURA 39 – CROMATOGRAMAS E ESPECTROS DE UV DOS ISOLADOS OMA2, OMA2A, OMA2B, OMA2C E OMA2D OBTIDOS DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO DAS RAÍZES DE *Ottonia martiana* (CLAE).



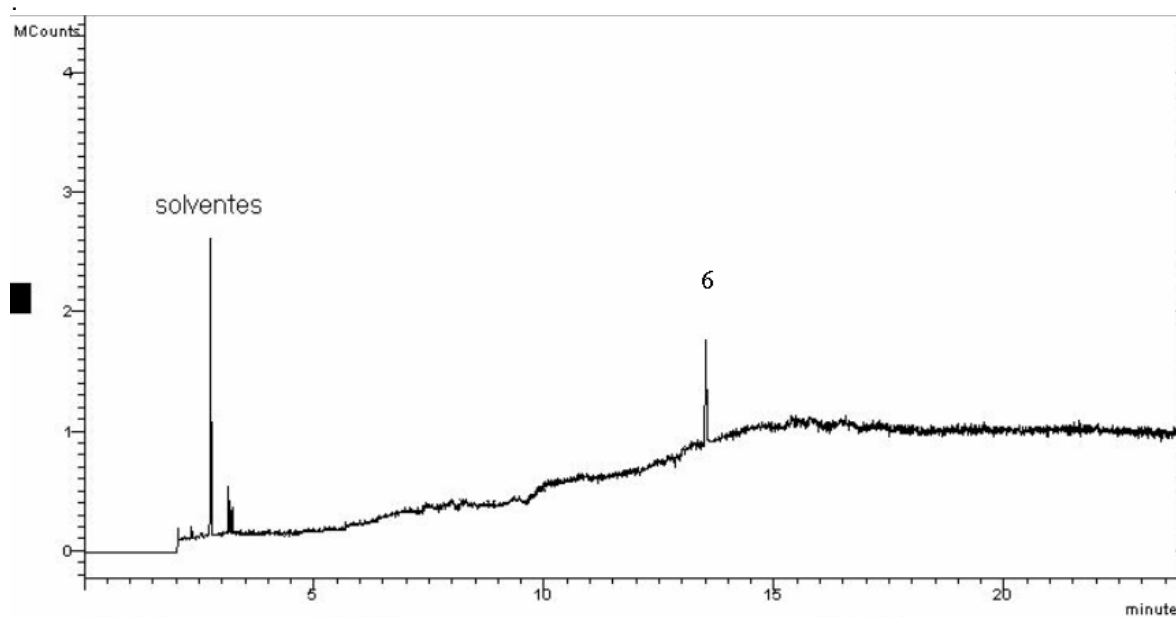


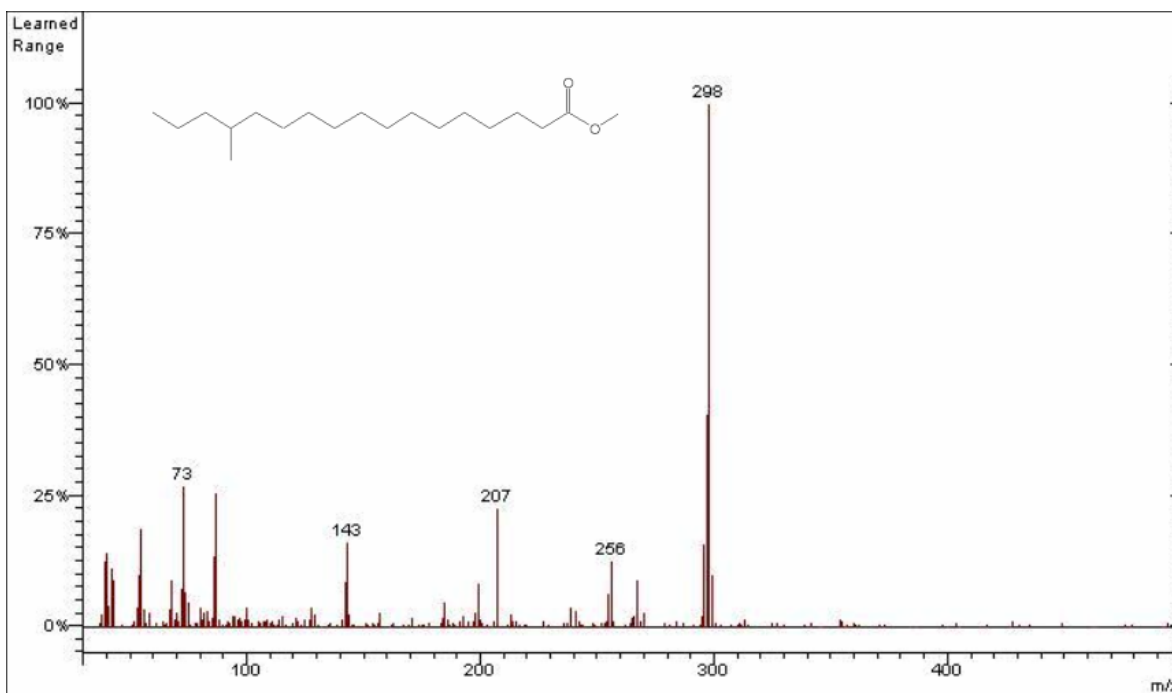
4.2.3 OMA3

Na análise por CG-EM o isolado OMA3 exibiu um pico majoritário, com dados compatíveis com àqueles descritos para metil-éster-14-metil-ácido heptadecanóico. Embora estudos realizados por SIDDIQUI et al. (2005) com extratos das sementes de *Piper nigrum* Linn revelaram que esta substância apresenta propriedade inseticida frente a larvas de *Aedes aegypti* e *Anopheles stephensi* Liston, esta análise revelou pela primeira vez a presença de um éster metílico de ácido graxo nesta espécie vegetal.

O cromatograma com o respectivo espectro de massas do isolado OMA3 analisado por CG-EM (condição de análise B) encontra-se inserido na Figura 40, a seguir.

FIGURA 40 – CROMATOGRAMA E ESPECTRO DE MASSAS DO ISOLADO OMA3



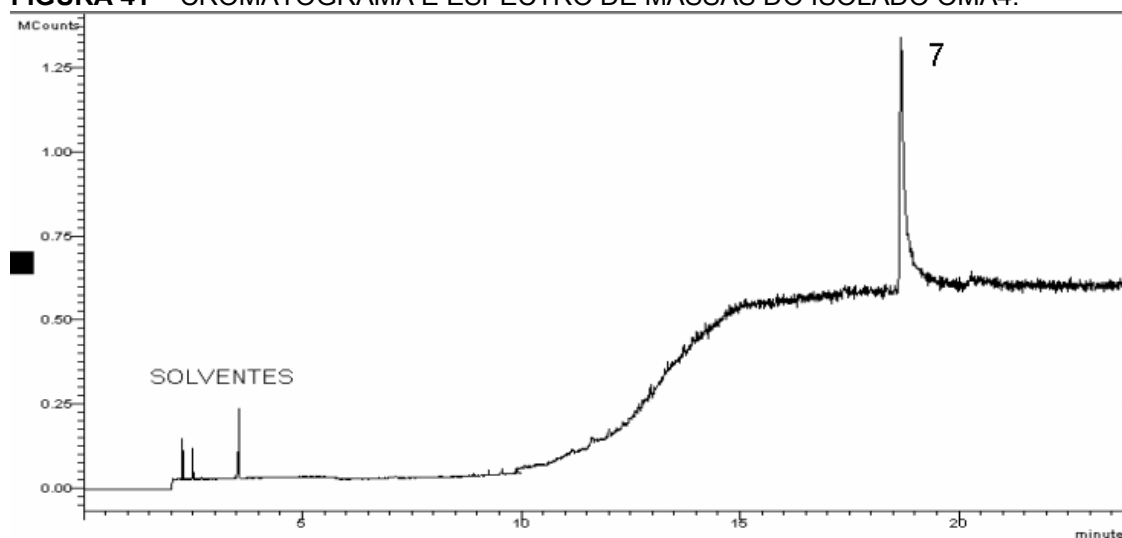


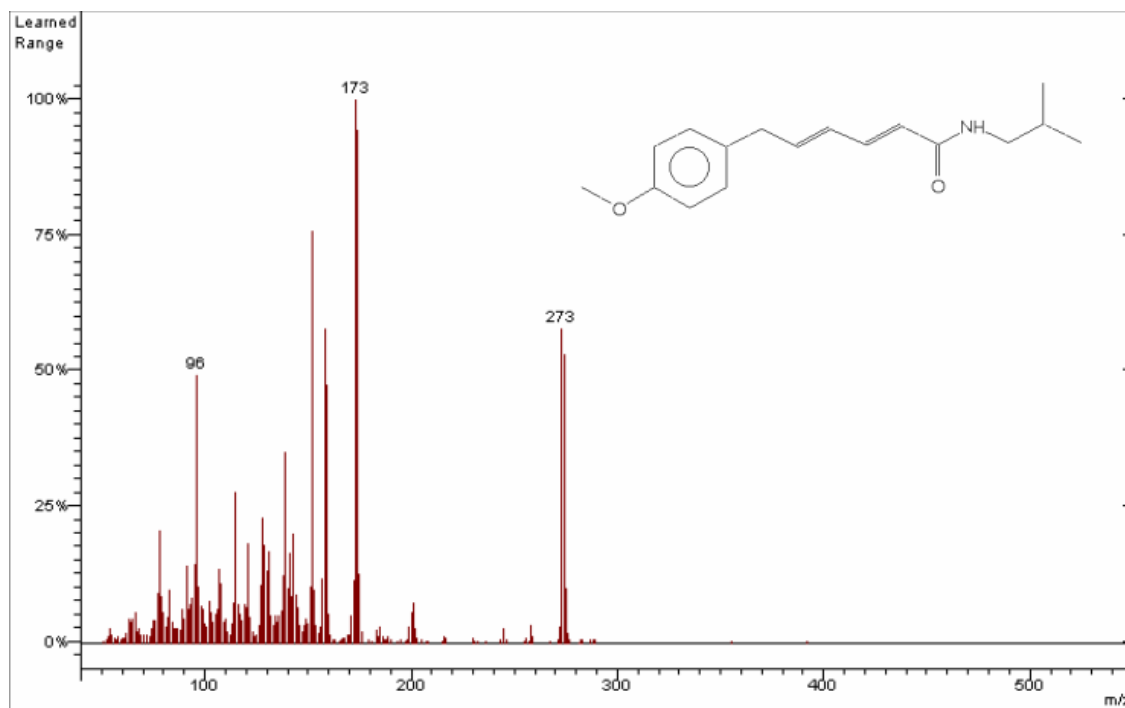
OMA3(6): $C_{19}H_{38}O_2$. Sólido branco. [metil-éster-14- metil-Ácido-heptadecanóico]. EM m/z (rel. int): 298 ($[M]^+$, 100%), 256 (12%), 207 (22%), 143 (16%), 87 (26%), 73 (27%).

4.2.4 OMA4

A análise qualitativa do isolado OMA4 (Figura 41) foi realizada por meio de CG-EM (condição de análise A).

FIGURA 41 – CROMATOGRAMA E ESPECTRO DE MASSAS DO ISOLADO OMA4.





OMA4(7): $C_{17}H_{23}NO_2$. Cristais brancos. [(2E,4E)-N-isobutil-6-(4-metóxfenil) hexa-2,4-dienamida]. Mp. 115-119 °C. EM m/z (rel. int): 273 ($[M]^{+}$, 58%), 201 (7%), 173 (100%), 159 (48%), 152 (76%), 139 (35%), 121 (18%), 115 (27%), 96 (49%).

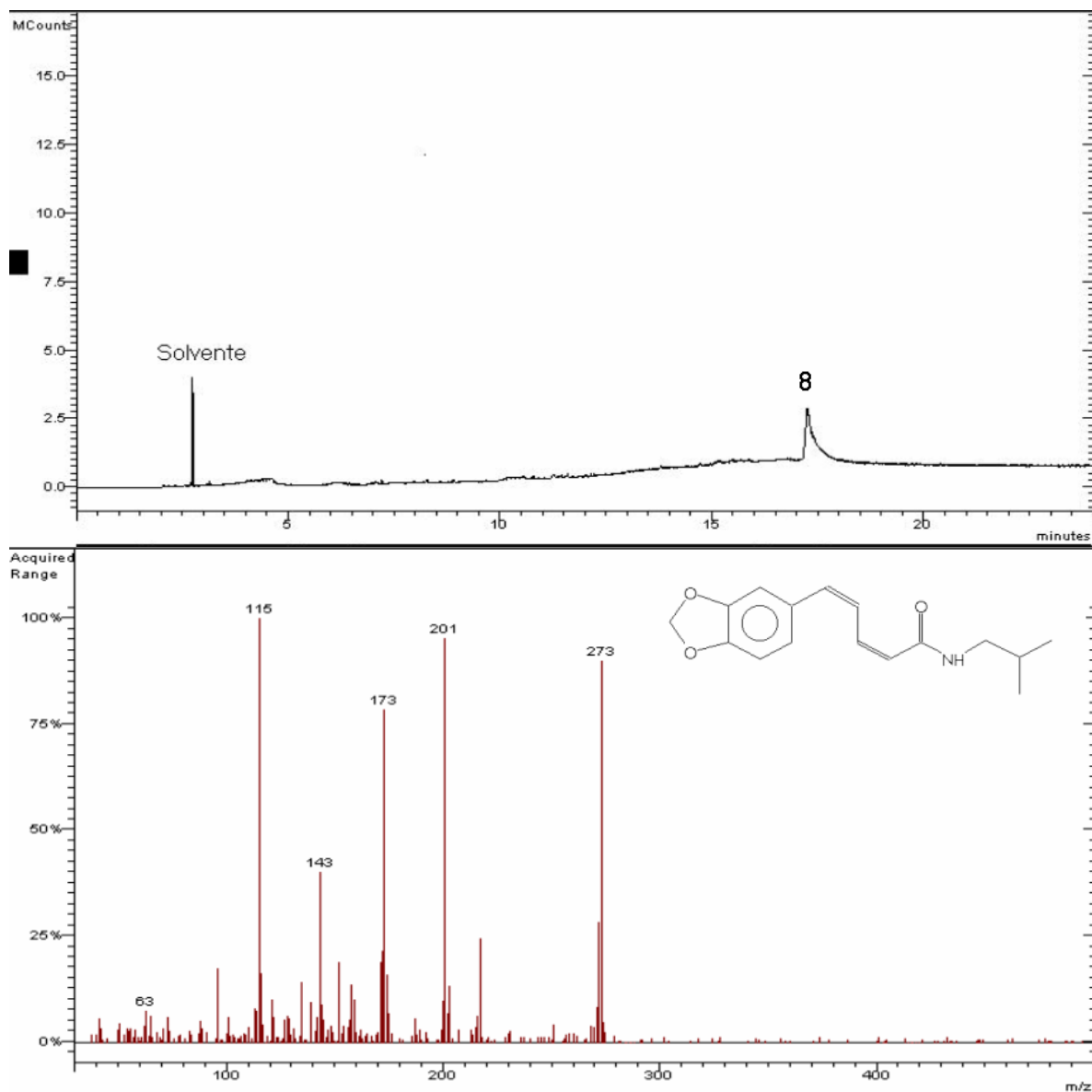
Os dados obtidos foram similares aos descritos anteriormente para OMA1, e permitiram identificar OMA4(7) como piperovatina.

4.2.5 OMA5

O cromatograma e o espectro de massas do isolado OMA5 obtido na análise por CG-EM (condição de análise B) encontram-se inseridos na Figura 42, onde pode se observar íon molecular m/z 273 Da, sinais de fragmentos m/z 201 e 173 Da originados por rupturas no grupo carbonila e no nitrogênio da amida. Os dados assim exibidos foram similares aos descritos anteriormente para OMA2(5) e

aos registrados na literatura científica, permitindo identificar OMA5(8) como isopiperlonguminina.

FIGURA 42 – CROMATOGRAMA E ESPECTRO DE MASSAS DO ISOLADO OMA5.



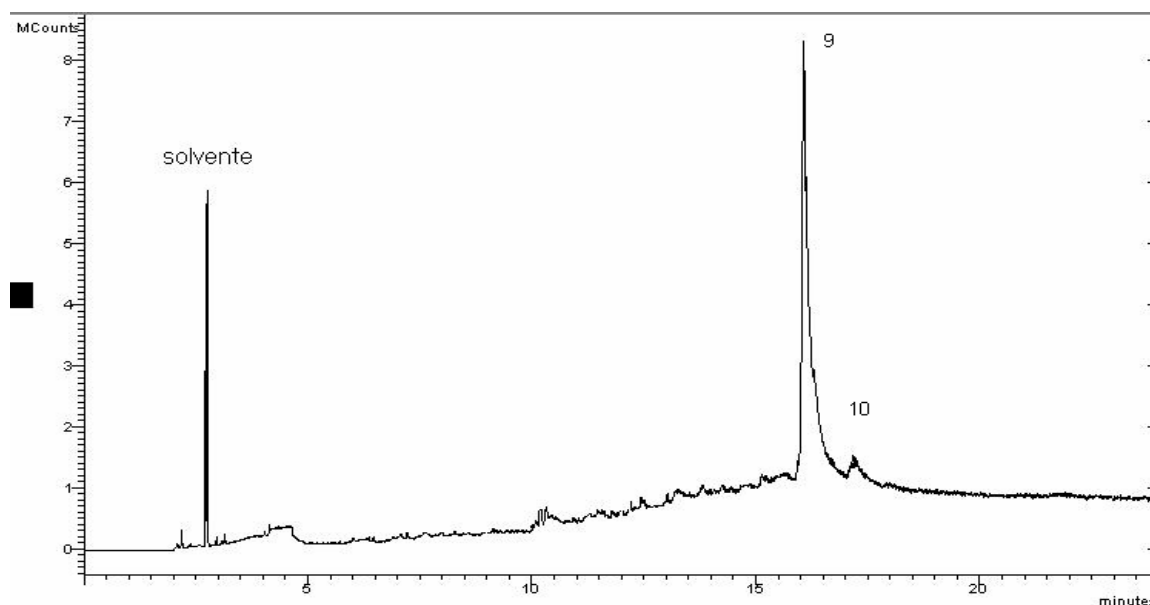
OMA5(8): $C_{16}H_{19}O_3N$. [2,4 pentadienamida, 5-(1,3-benzodioxol-5-il)-*N*-(2-metilpropil)-(Z,Z)]. Sólido amarelo. Mp 139-141 °C. EM m/z (rel. int): 273 ($[M]^+$, 92%), 216 (3%), 201 (97%), 173 (77%), 172 (22%), 159 (8%), 152 (9%), 143 (39%), 139 (3%), 135 (8%), 121 (5%), 115 (100%), 96 (5%).

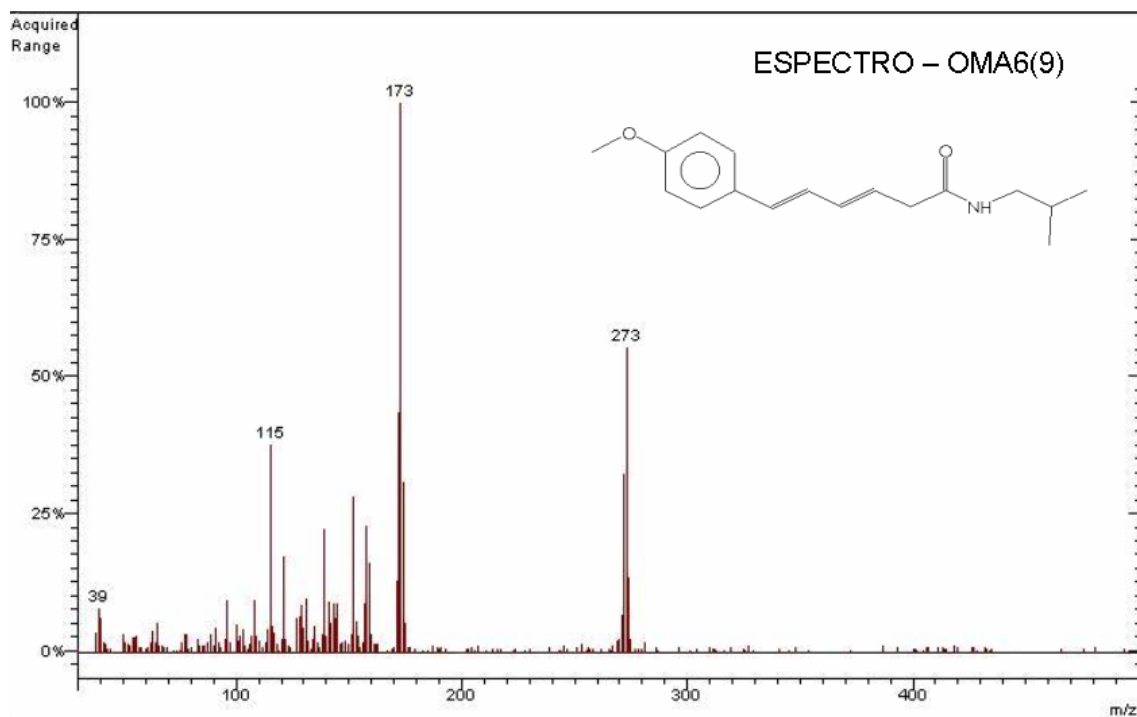
4.2.6 OMA6

O isolado OMA6 obtido como cristais branco-amarelados, foi analisado por CG-EM (condição de análise B).

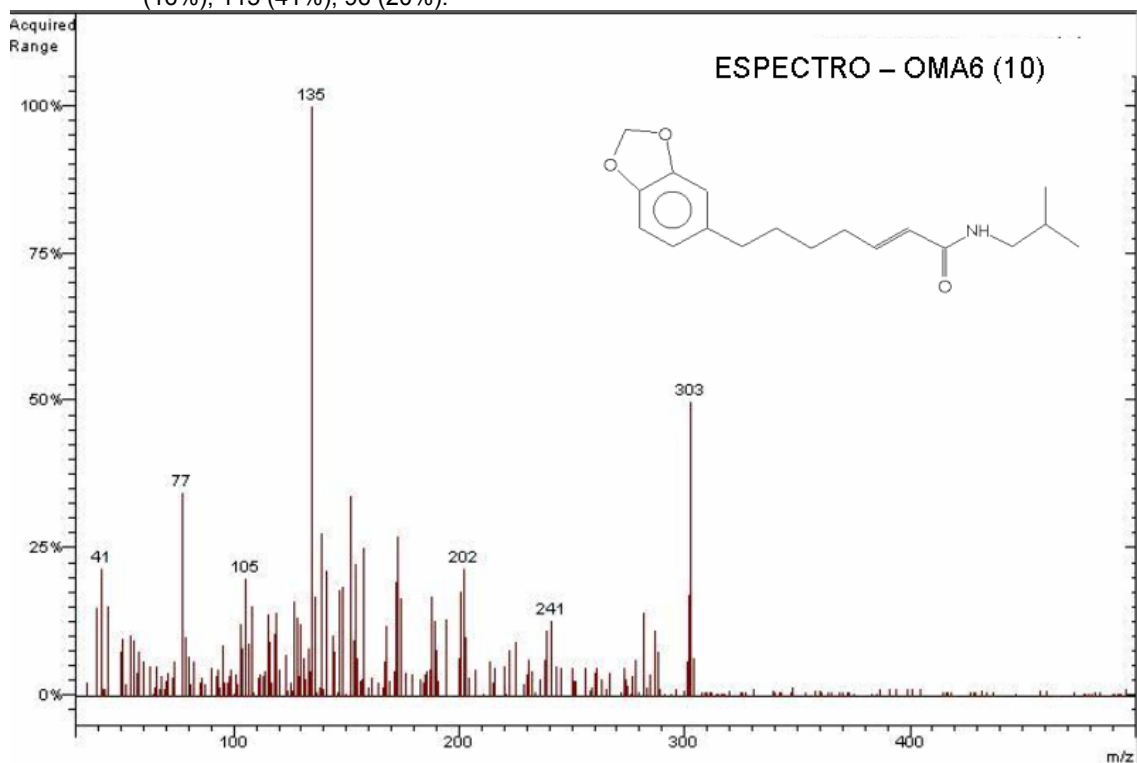
O cromatograma deste isolado (Figura 43) revelou a presença de 2 substâncias com os respectivos íons moleculares m/z 273 e 303. Os dados exibidos no espectro de massas de OMA6 permitiram identificar OMA6(9) como (3*E*,5*E*)-*N*-isobutil-6-(4-metóxfenil)hexa-3,5-dienamida e OMA6(10) como pipercalosidina. Embora a pipercalosidina tenha sido previamente isolada de outra espécie de Piperaceae e seja conhecida por sua propriedade inseticida (PRING, 1982; MCFERREN; RODRIGUES, 1998), a presença desta amida em *O. martiana* é inédita.

FIGURA 43 – CROMATOGRAMA DO ISOLADO OMA6(9)(10) OBTIDO DAS RAÍZES DE *Ottonia martiana* (FRAÇÃO HEXANO 68-72) E OS ESPECTROS DE MASSAS DOS SEUS RESPECTIVOS CONSTITUINTES.





OMA6(9): $C_{17}H_{23}NO_2$. Cristais brancos. [(3*E*,5*E*)-*N*-isobutil-6-(4-metóxi-fenil)hexa-3,5-dienamida]. EM m/z (rel. int): 273 ($[M]^+$, 55%), 201 (3%), 173 (100%), 159 (16%), 152 (39%), 139 (24%), 121 (16%), 115 (41%), 96 (20%).

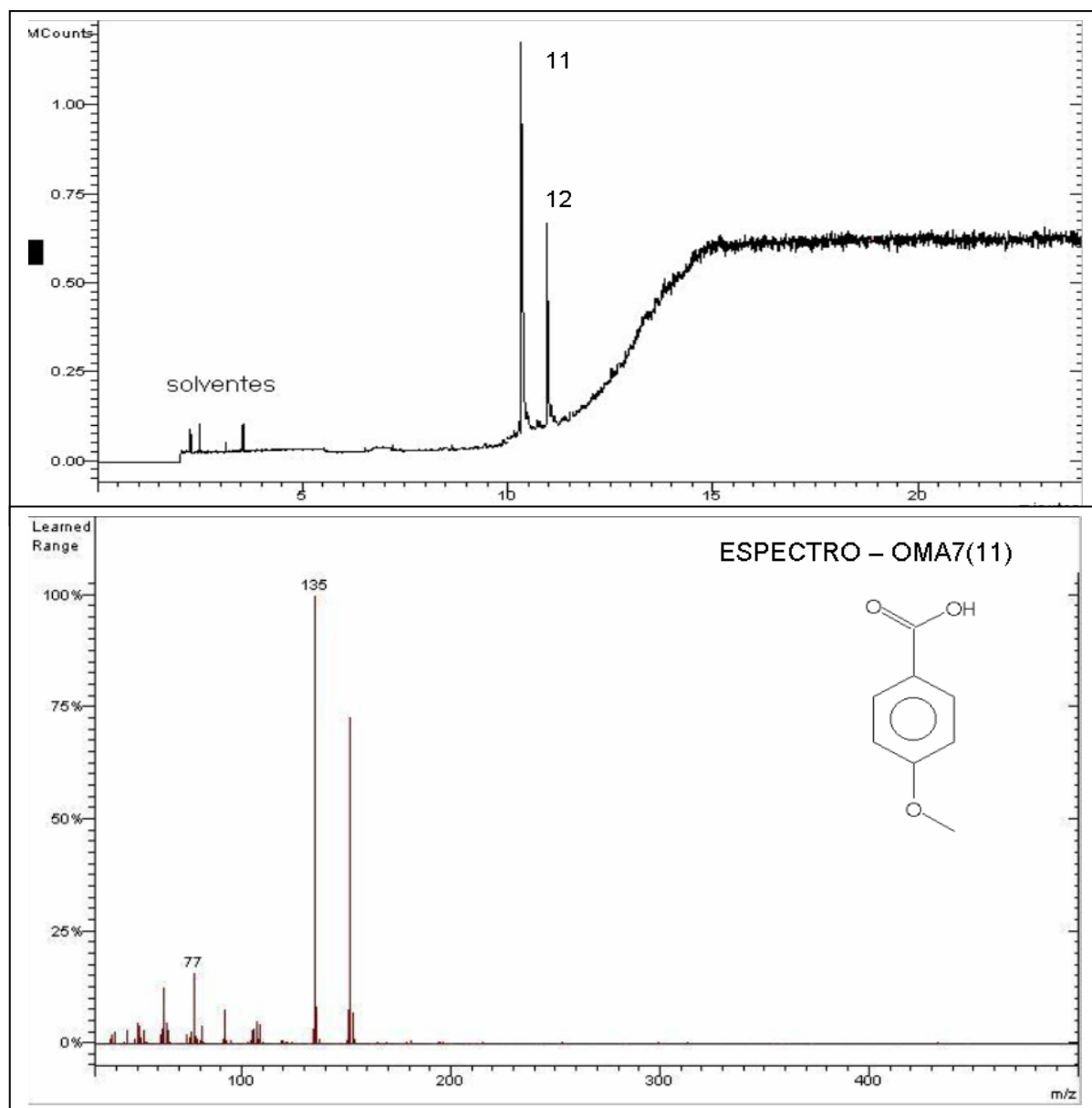


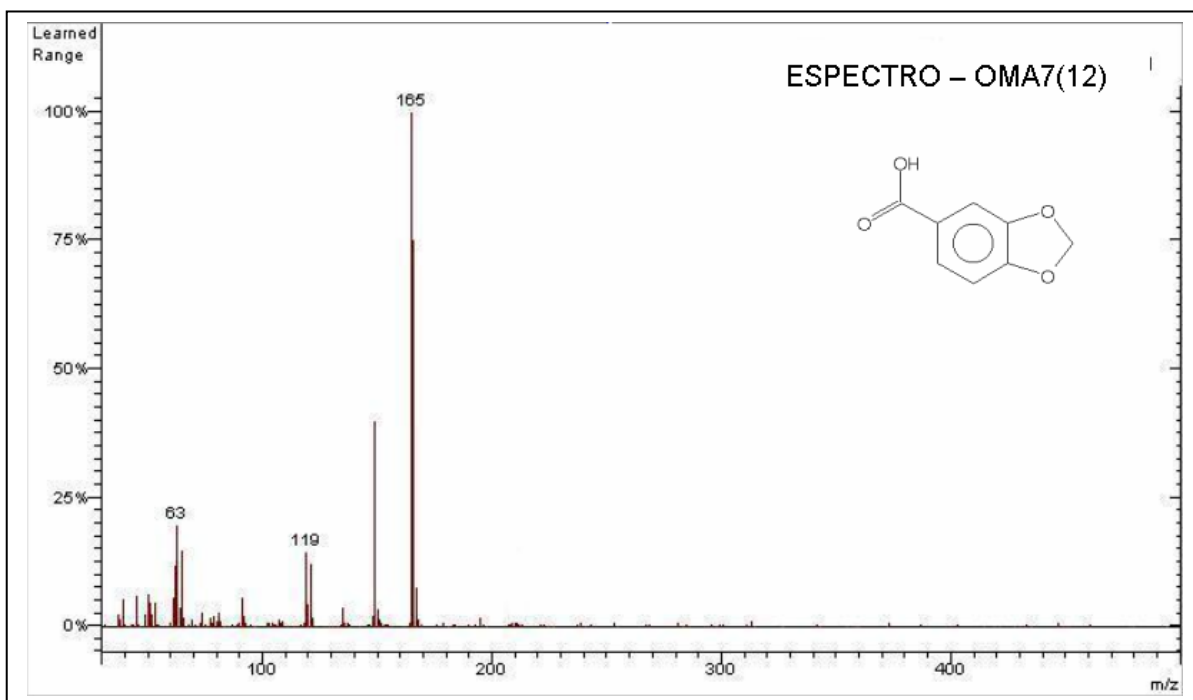
OMA6(10): $C_{18}H_{25}NO_3$. Cristais branco-amarelados. [*N*-isobutil-(*E*)-7-(3,4-metilenodioxifenil)-hept-2-enamida]. EM m/z (rel. int): 303 ($[M]^+$, 50%), 241 (13%), 230 (4%), 203 (10%), 202 (22%), 188 (17%), 173 (27%), 168 (12%), 158 (25%), 154 (22%), 152 (34%), 139 (27%), 135 (100%), 115 (14%), 77 (34%), 57 (4%), 41 (22%).

4.2.7 OMA7

O isolado OMA7 obtido como sólido branco exibiu na análise por CG-EM (condição de análise B) os respectivos íons moleculares m/z 152 e 166, revelando desta forma tratar-se de uma mistura de 2 substâncias (Figura 44).

FIGURA 44 - CROMATOGRAMA E ESPECTROS DE MASSAS DOS CONSTITUINTES DO ISOLADO OMA7.





OMA7(11):C₈H₈O₃. Sólido branco. Ácido *p*-anísico. MS *m/z* (rel. int): 152 ([M]⁺, 74%), 135 (100%), 92 (11%), 77 (21%), 63 (14%).

OMA7(12):C₈H₆O₄. Sólido branco (cristais branco-amarelados). Ácido piperonílico. MS *m/z* (rel. int): 166 ([M]⁺, 81%), 165 (100%), 149 (40%), 121 (12%), 119 (15%), 63 (19%).

Os dados espectrais de massas (CG-EM) foram consistentes com aqueles descritos na literatura e nas bibliotecas eletrônicas SATURN e NIST para o ácido *p*-anísico e ácido piperonílico, respectivamente.

Apesar de não ser novidade a presença de ácidos fenólicos em diversas espécies vegetais (GOTTLIEB; MAGALHÃES, 1958; BARBOSA-FILHO et al., 2004), esta é a primeira vez que se relata o isolamento de uma mistura contendo os ácidos *p*-anísico e piperonílico a partir do EBEtOH de *O. martiana*. Contudo, é importante ressaltar que estes ácidos apresentam diversas atividades biológicas, dentre as quais destacam-se as propriedades alelopáticas do ácido *p*-anísico sobre a germinação das sementes de alface (SCHLOMAN JR et al., 1991) e

antisséptica, além da significativa atividade antihepatotóxica frente a CCl_4 e paracetamol (GADGOLI; MISHRA, 1999).

Também, cabe ressaltar que o ácido piperonílico tem sido empregado como precursor na síntese de amidas inseticidas (ESTRELA et al., 2003).

4.2.8 OMA8

A identificação do precipitado OMA8(13) foi realizada por meio da análise de Difração de Raios-X (DRX), cujos dados encontram-se inseridos na Tabela 9, a seguir.

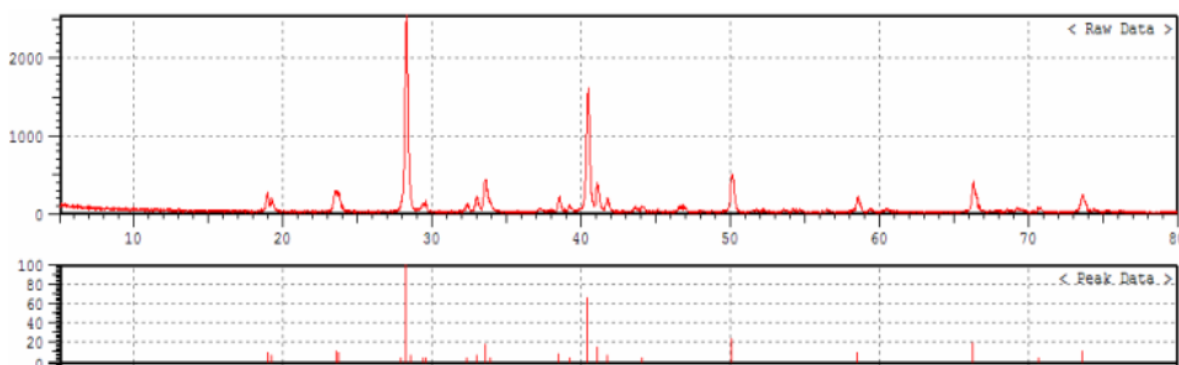
TABELA 9 – DADOS DA ANÁLISE DE DIFRAÇÃO DE RAIOS-X DO PRECIPITADO OMA8(13).

2 θ	D
28,2607	3,15530
40,4370	2,22887
50,1149	1,81878

2 θ – ângulo de difração 2 θ
d – distância interplanar

Os 3 picos mais intensos revelados no difratograma deste precipitado (Figura 45) foram os seguintes (ordem decrescente): 28,26 $^\circ$; 40,43 $^\circ$ e 50,11 $^\circ$ em 2 theta.

FIGURA 45 – DIFRATOGRAMA DO PRECIPITADO OMA8(13) DA FASE ACETATO DE ETILA OBTIDA DO EXTRATO DAS RAÍZES DE *Ottonia martiana*.



Pelos reflexos mais intensos do difratograma anteriormente apresentado e comparação com dados de literatura e da biblioteca eletrônica para espectros de DRX (JCPDS – ICDD 2001), o precipitado OMA8 (13) foi identificado como nitrato de sódio (NaNO_3).

Apesar do sal NaNO_3 já ter sido obtido das partes aéreas desta espécie vegetal (LOPES, 1989), esta é a primeira vez que se registra o isolamento do mesmo a partir das raízes de *O. martiana*.

Estudos recentes da bioinorgânica têm revelado que o efeito medicinal de algumas plantas se deve também aos seus componentes inorgânicos. Diante disso, é importante mencionar o cátion sódio (Na^+) que apresenta papel fundamental no metabolismo celular como, por exemplo, na transmissão do impulso nervoso através do mecanismo bomba de sódio, na manutenção do volume e da osmolaridade, assim como nas contrações musculares, no equilíbrio ácido-base e na absorção de nutrientes pelas células (FRANCO, 1998). Também é importante mencionar o íon nitrato (NO_3^-), cuja ingestão superior a 5,0 mg/kg/dia, segundo TURAZI et al. (2006), representa uma ameaça à saúde

humana pela capacidade que este apresenta de ser reduzido no trato digestório a nitrito, assim como de poder formar na corrente sanguínea as nitrosaminas, substâncias carcinogênicas, mutagênicas e teratogênicas (BARTSCH; MONTESANO, 1984; REYES; SCANLAN, 1984). Outrossim, não se pode deixar de mencionar que o íon nitrato forma sais hidrossolúveis com átomos de sódio, potássio e cálcio, sendo a concentração destes em vegetais associada às variedades, nível de fertilidade do solo, drenagem do solo, e a disponibilidade de água (SILVA, 2005).

4.2.9 OMA9

O precipitado OMA9 foi analisado pela técnica de Difração de Raios-X (DRX), cujos dados encontram-se inseridos na Tabela 10.

TABELA 10 – DADOS DA ANÁLISE DE DIFRAÇÃO DE RAIOS -X DO PRECIPITADO OMA9(14)

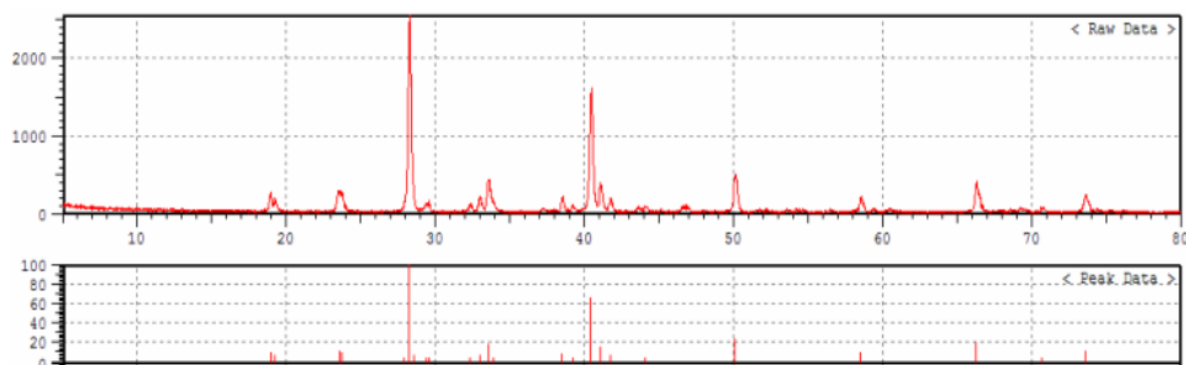
2 θ	d
32,4095	2,76023
19,2395	4,60958
34,1492	2,62349

2 θ – ângulo de difração 2 θ

d – distância interplanar

Os 3 picos mais intensos revelados no difratograma deste precipitado (Figura 46) foram os seguintes (ordem decrescente): 32,40⁰; 19,23⁰ e 34,14⁰ em 2 theta.

FIGURA 46 – DIFRATOGRAMA DO PRECIPITADO OMA9(14) OBTIDO DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO DOS CAULES DE *Ottonia martiana*.



Os reflexos mais intensos do difratograma supracitado, aliados à comparação com dados de literatura e da biblioteca eletrônica para espectros de DRX (JCPDS – ICDD 2001), permitiram identificar o precipitado OMA9(14) como nitrato de sódio (NaNO_3).

4.2.10 OMA10

A identificação do precipitado OMA10 também foi realizada por meio da análise de Difração de Raios-X (DRX), cujos resultados encontram-se inseridos na Tabela 11, a seguir.

TABELA 11 – DADOS DA ANÁLISE DE DIFRAÇÃO DE RAIOS-X DO PRECIPITADO OMA10(15)

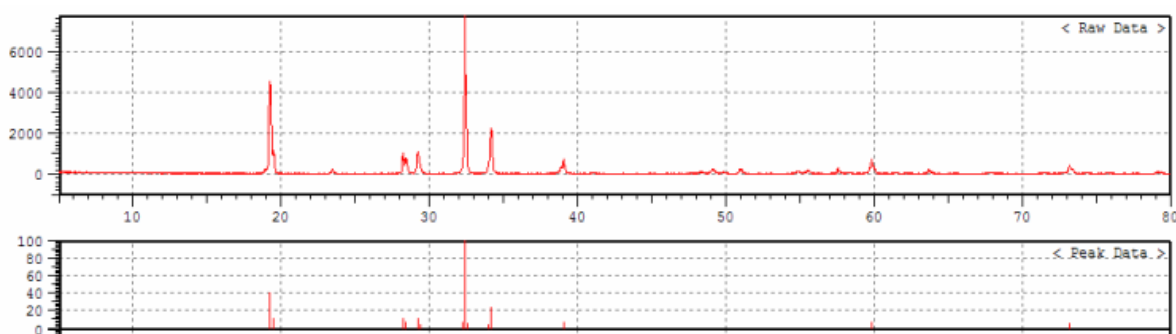
2θ	d
32,4095	2,76023
19,2395	4,60958
34,1492	2,62349

2θ – ângulo de difração 2θ

d – distância interplanar

Os 3 picos mais intensos revelados no difratograma deste precipitado (Figura 47) foram os seguintes (ordem decrescente): $32,40^\circ$; $19,23^\circ$ e $34,14^\circ$ em 2 theta.

FIGURA 47 – DIFRATOGRAMA DO PRECIPITADO OMA10 (15) OBTIDO DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO DOS CAULES DE *Ottonia martiana*.



Os reflexos mais intensos do difratograma anteriormente exibido foram comparados com os dados de literatura e da biblioteca eletrônica para espectros de DRX (JCPDS – ICDD 2001), os quais permitiram identificar este precipitado como sulfato de sódio (Na_2SO_4).

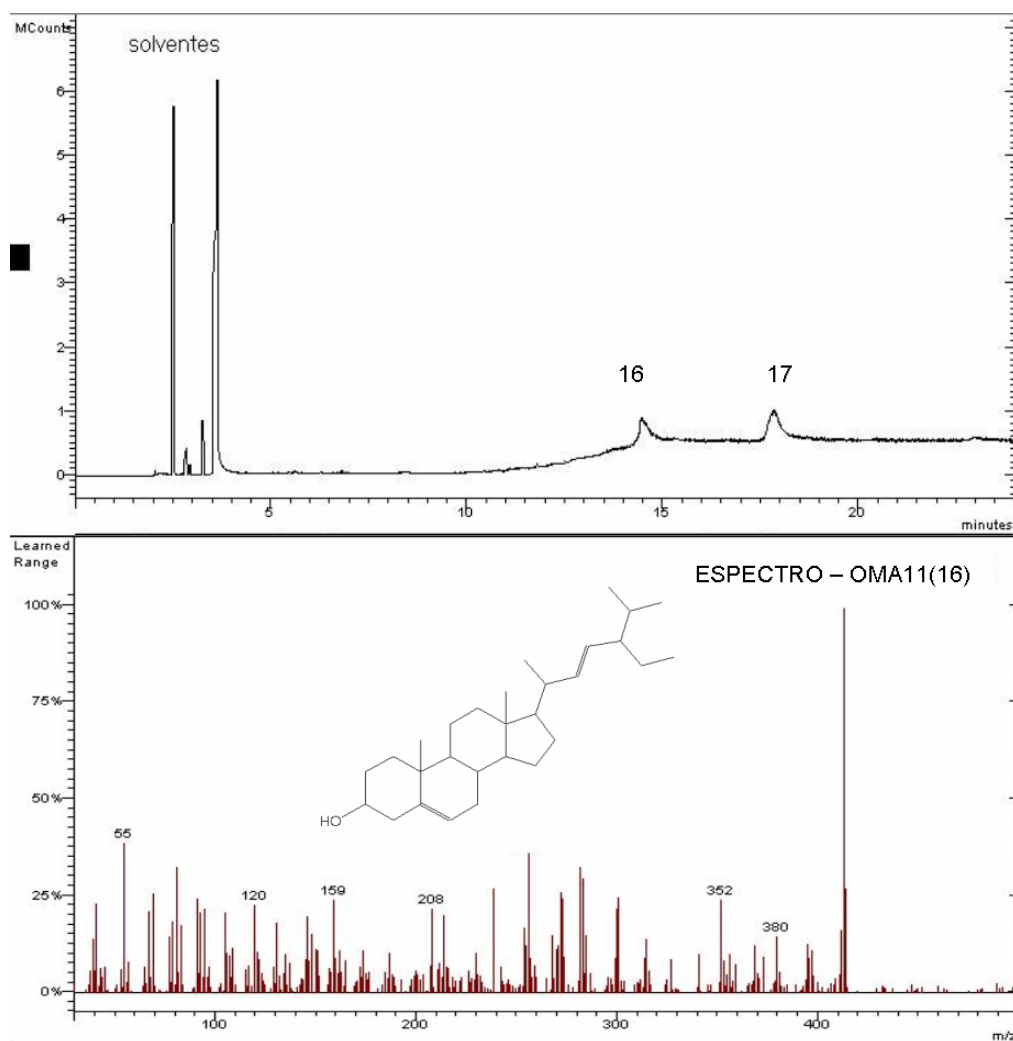
No passado, este sal decahidratado era empregado na terapêutica humana como laxante.

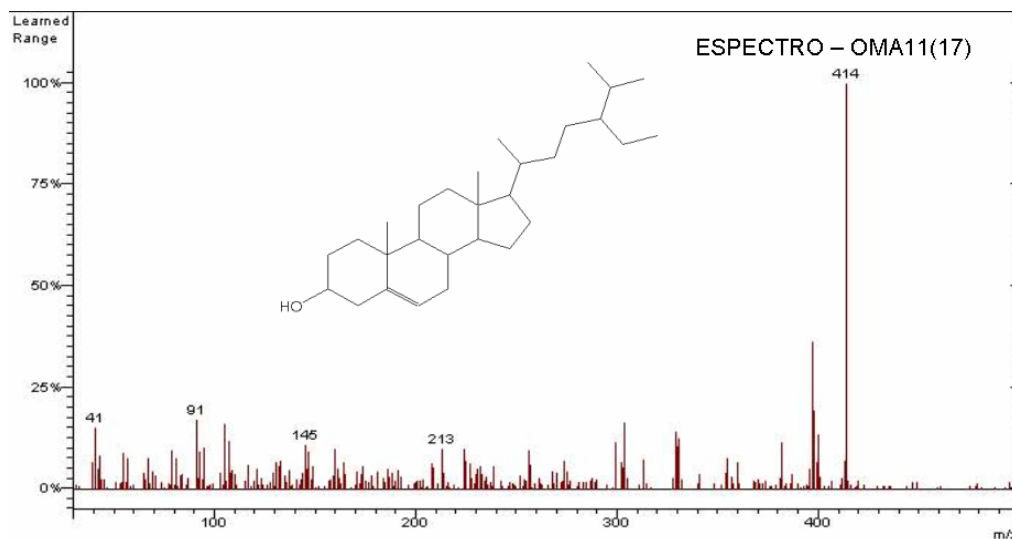
É importante ressaltar que esta é a primeira vez que se isola sulfato de sódio de espécies do gênero *Ottonia*.

4.2.11 OMA11

O isolado OMA11 analisado por CG-EM (condição de análise C) foi obtido como sólido branco, apresentando íons moleculares m/z 412 e 414, respectivamente (FIGURA 48).

FIGURA 48 - CROMATOGRAMA E ESPECTRO DE MASSAS DO ISOLADO OMA11 (16)(17) OBTIDO DOS CAULES DE *Ottonia martiana*.





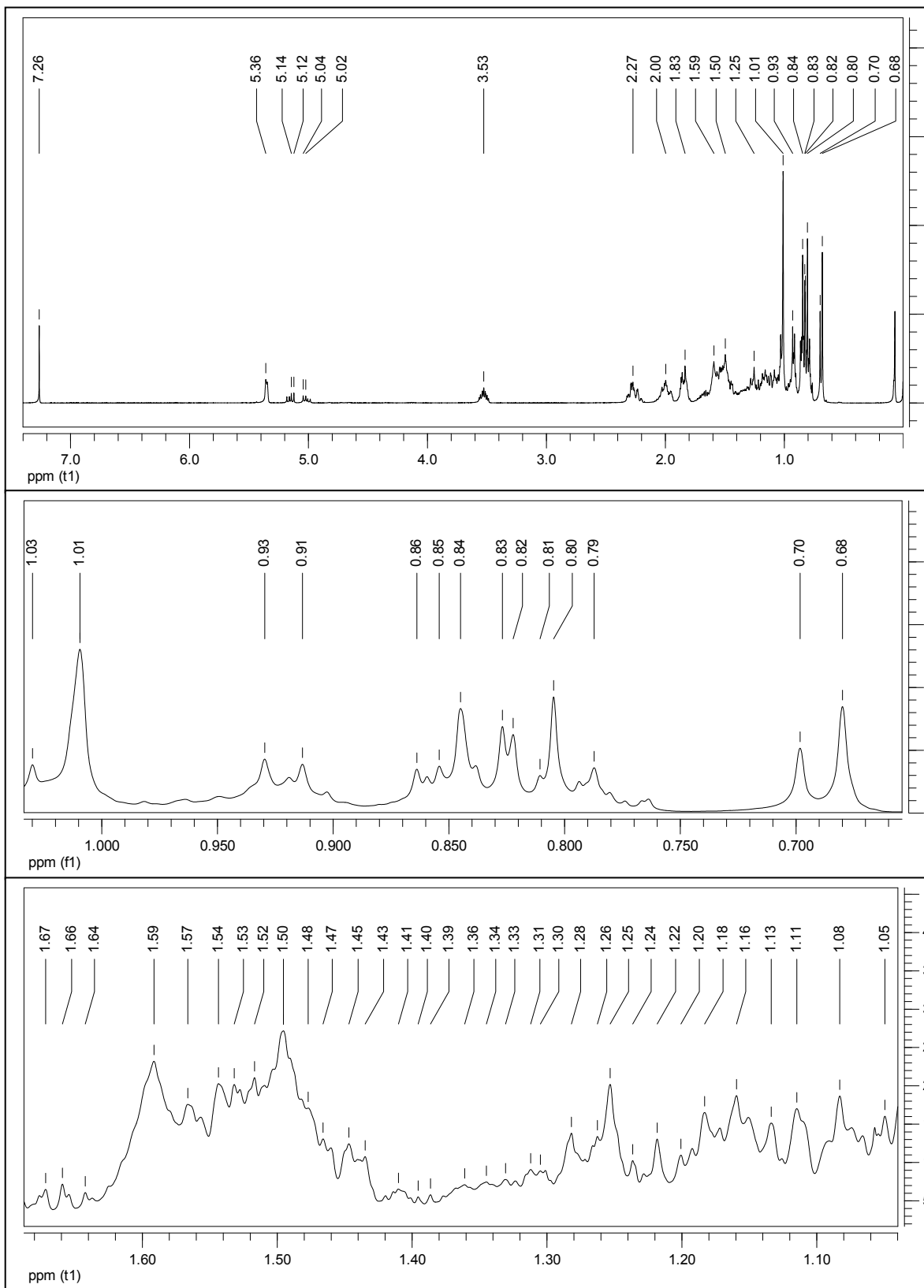
OMA11(16): $C_{29}H_{48}O$. Sólido branco. (Estigmasterol). EM m/z (rel. int): 412 ($[M]^{*+}$, 12%), 395 (12%), 352 (24%), 256 (36%), 255 (12%), 214 (20%), 213 (4%), 159 (25%), 55 (39%).

OMA11(17): $C_{29}H_{50}O$. Sólido branco (cristais branco-amarelados). (β -sitosterol). EM m/z (rel. int): 414 ($[M]^{*+}$, 100%), 256 (10%), 255 (10%), 214 (4%), 147 (7%), 145 (10%), 107 (8%), 105 (17%), 91 (18%), 41 (15%).

Os dados espectrais de massas (CG-EM) foram compatíveis aos das bibliotecas eletrônicas SATURN e NIST para estigmasterol e β -sitosterol, respectivamente. Embora estes fitoesteróis sejam encontrados em diversas espécies de Piperaceae (PARMAR et al., 1997), cabe salientar que é inédito o isolamento desta mistura de esteróides na espécie *Ottonia martiana*.

As estruturas da mistura esteroidal também foram confirmadas e elucidadas por meio da análise dos espectros de RMN de 1H e ^{13}C obtidos num aparelho Bruker – Avance 400 - 9,7 Tesla (1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz). Os espectros de RMN de 1H e ^{13}C , assim como do DEPT 135, encontram-se inseridos nas Figuras 49 e 50, a seguir.

FIGURA 49 – ESPECTROS DE RMN DE ^1H DO ISOLADO OMA11 OBTIDO DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO DOS CAULES DE *Ottonia martiana*.
[Bruker – Avance 400 - 9,7 Tesla (^1H : 400 MHz; δ : ppm; temperatura ambiente)]



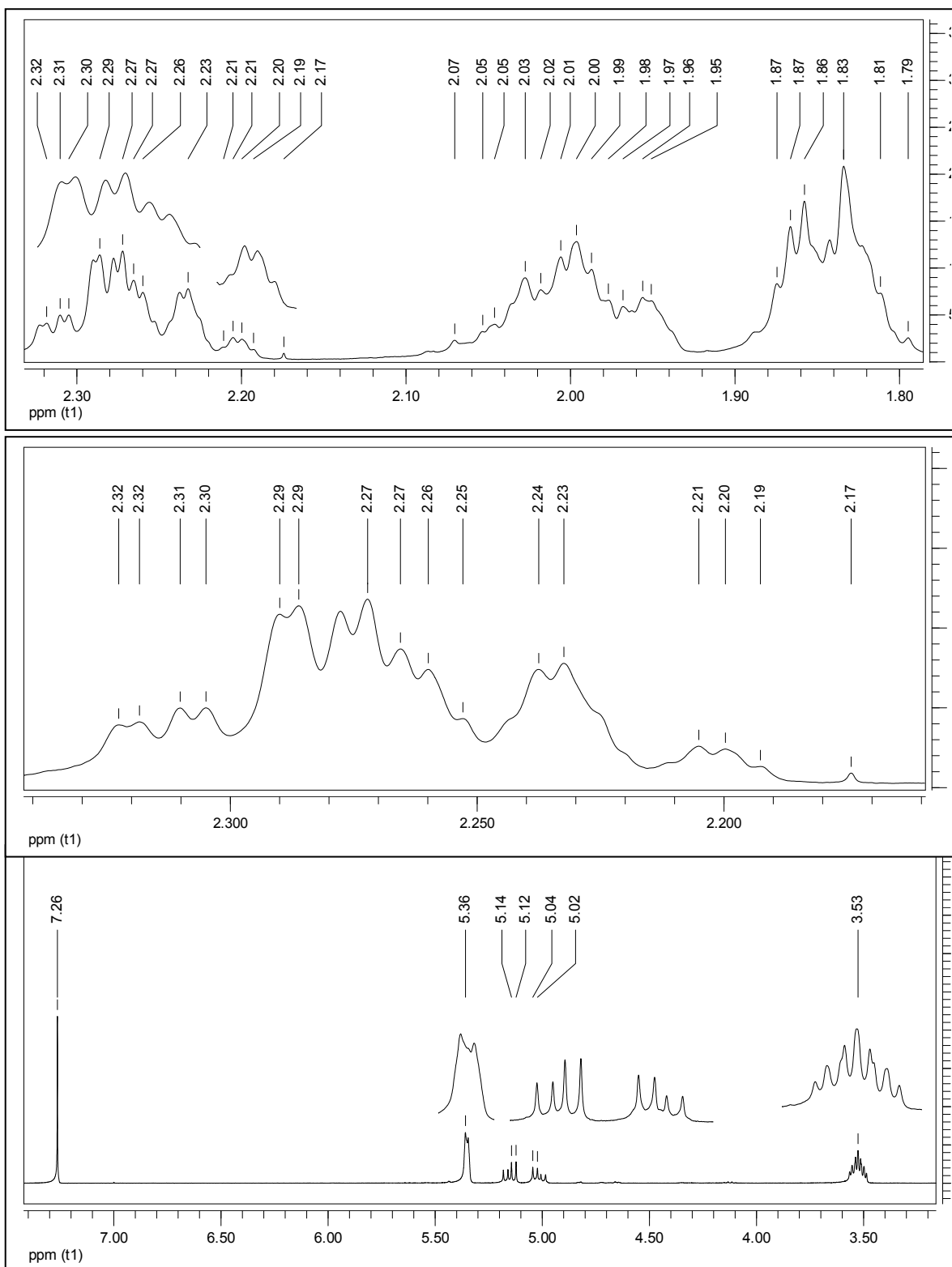
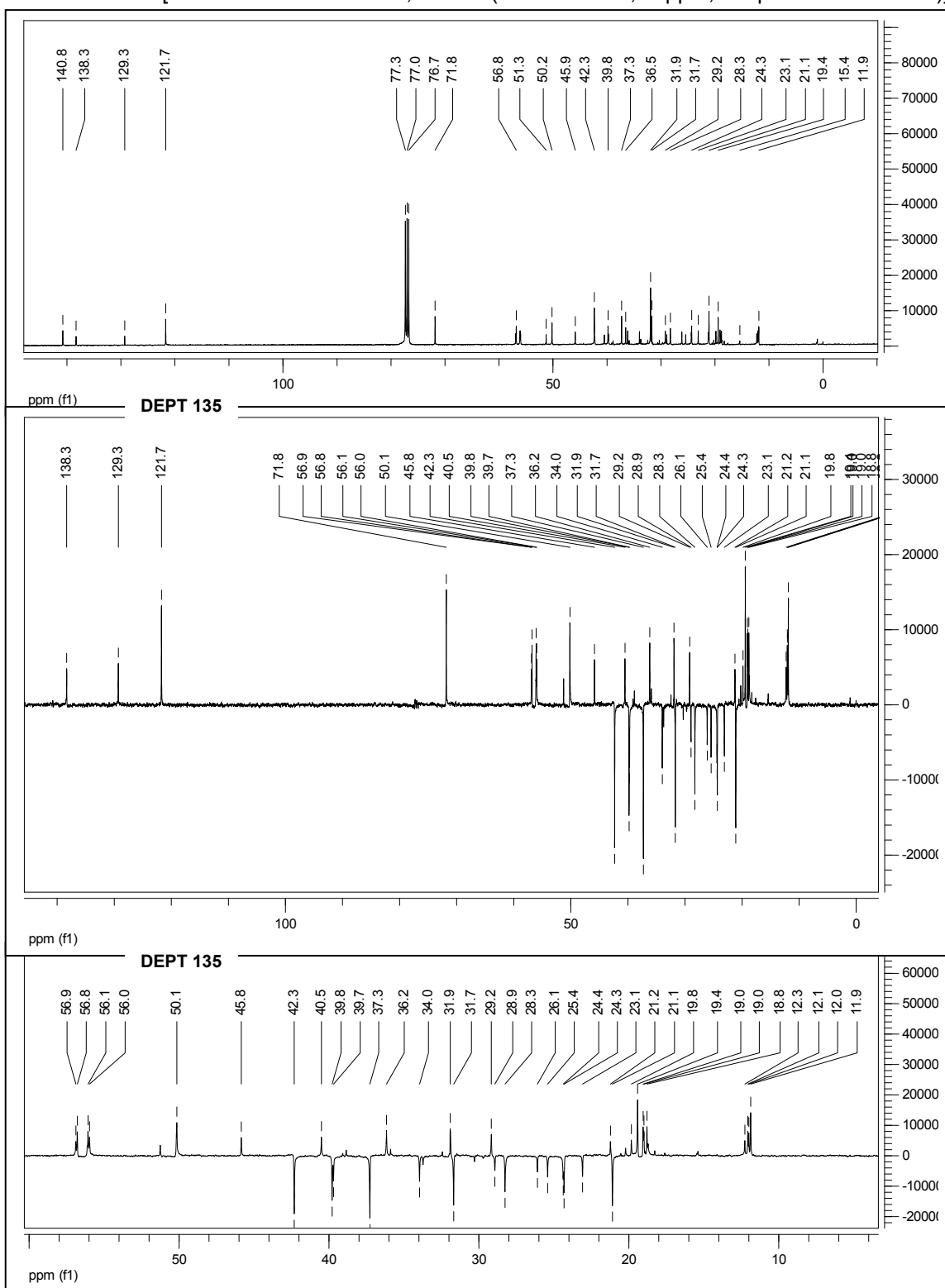


FIGURA 50 – ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C E DEPT 135 DO ISOLADO OMA1 OBTIDO DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO DOS FRUTOS DE *Ottonia martiana* [Bruker – Avance 400 - 9,7 Tesla (^{13}C : 100 MHz; δ : ppm; temperatura ambiente)].



No espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , TMS) (Figura 49), a presença dos esteróides estigmasterol e β -sitosterol é ressaltada pela presença dos sinais em δ 5,35 (*d*, $J = 5,04$ Hz) e 3,52 (*m*) relativos respectivamente, aos hidrogênios H_6 e H_3 , e de um grande número de sinais intensos (δ 0,68 - 2,35) atribuídos a vários grupos de hidrogênios metílicos e metilênicos que caracterizam o esqueleto esteroidal. As diferenças espectrais restringem-se essencialmente à cadeia lateral pela presença da ligação dupla entre C_{22} e C_{23} no estigmasterol, a qual é evidenciada pelas absorções dos hidrogênios vinílicos adicionais em δ 5,15 (*dd*, $J = 8,1$ e $15,2$ Hz, H_{22}) e δ 5,04 (*dd*, $J = 8,1$ e $15,2$ Hz, H_{23}).

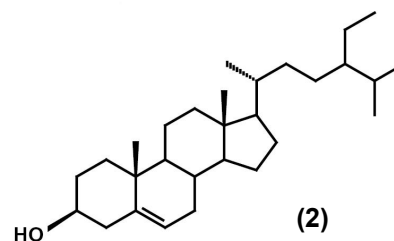
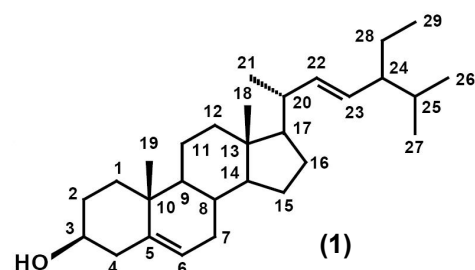
Pela integração dos sinais a δ 5,36 (H_6); 5,15 (H_{22}); 5,04 (H_{23}) e 3,52 (H_3) foi possível evidenciar a proporção de 1:1 dos esteróides β -sitosterol e estigmasterol (3:1:1:3) no isolado OMA11.

O espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , TMS) (Figura 50) da mistura esteroidal apresentou os sinais δ 140,8 e 121,7 ppm, característicos da ligação dupla entre C_5 e C_6 ; sinal δ 71,8 ppm, atribuído ao carbono carbinólico C_3 comum aos dois esteróides; sinais δ 138,3 e 129,3 ppm, característicos da ligação dupla entre C_{22} e C_{23} do estigmasterol.

As informações espectrais de RMN ^{13}C do isolado OMA11 encontram-se disponíveis na Tabela 12, e estão de acordo com os dados das misturas de esteróides já descritos na literatura para estigmasterol e β -sitosterol (RODRIGUES, 1992; GOULART et al., 1993; SUBHADHIRASAKUL; PECHPONGS, 2005).

TABELA 12 – RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , TMS) E DEPT 135 DA MISTURA DE ESTERÓIDES DO ISOLADO OMA11.

R M N	ESTIGMASTEROL (1)		β -SITOSTEROL (2)	
	C	DEPT 135 δ_c (ppm)	DEPT 135 δ_c (ppm)	
1	CH ₂	37,3	CH ₂	37,3
2	CH ₂	31,7	CH ₂	31,7
3	CH	71,8	CH	71,8
4	CH ₂	42,3	CH ₂	42,3
5	C _q	140,8	C _q	140,8
6	CH	121,7	CH	121,7
7	CH ₂	31,9	CH ₂	31,9
8	CH	31,9	CH	31,9
9	CH	50,2	CH	50,2
10	C _q	36,5	C _q	36,5
11	CH ₂	21,1	CH ₂	21,1
12	CH ₂	39,8	CH ₂	39,8
13	C _q	42,3	C _q	42,3
14	CH	56,8	CH	56,8
15	CH ₂	24,3	CH ₂	24,3
16	CH ₂	28,2	CH ₂	28,2
17	CH	56,1	CH	56,1
18	CH ₃	11,9	CH ₃	11,8
19	CH ₃	19,4	CH ₃	19,4
20	CH	39,8	CH	36,2
21	CH ₃	21,1	CH ₃	18,8
22	CH	138,3	CH ₂	31,9
23	CH	129,3	CH ₂	29,7
24	CH	51,2	CH	39,7
25	CH	31,9	CH	31,7
26	CH ₃	19,0	CH ₃	21,1
27	CH ₃	19,0	CH ₃	19,8
28	CH ₂	26,2	CH ₂	18,8
29	CH ₃	12,3	CH ₃	12,0



Os esteróides estigmasterol e β -sitosterol são constituintes químicos muito comuns em plantas medicinais, e apresentam valiosas atividades biológicas tais como antiinflamatória, antimicrobiana (HANDA et al., 1992; CHATTOPADYAY et al., 2002), além de antihipercolesterolaêmica, efeito estrogênico (BUCKINGHAM, 1998), e ação gastroprotetiva recentemente evidenciada em experimentos com modelos em ratos com úlceras (NAVARRETE et al., 2002).

4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Na análise dos óleos essenciais das raízes (OMA12), frutos (OMA13) e folhas (OMA14) de *O. martiana* por CG-EM (condições de análise C), 77 substâncias foram identificadas, cerca de 68,22 a 78,87 % de seus constituintes. A identificação destas foi realizada por meio de comparação com dados de literatura (ADAMS, 1995), biblioteca eletrônica NIST (National Institute for Standard Technology – 62.235 compounds), índices de retenção (IR) e interpretação visual dos espectros de massas. Os índices de retenção (IR) foram calculados para todos os constituintes voláteis identificados de acordo com a equação de Van den Dool e Kratz (VAN DEN DOOL; KRATZ, 1963). Para tal, a série homóloga C₉ a C₂₀ foi utilizada sob as mesmas condições de análise (CG-EM). Os dados quantitativos foram obtidos por integração eletrônica das áreas dos picos oriundos da análise cromatográfica CG-FID (Método de Normalização de Área).

Resultados obtidos da análise qualitativa e quantitativa encontram-se inseridas na Tabela 13, a seguir.

TABELA 13 – COMPOSIÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS EXTRAÍDOS DA *Ottonia martiana*.

n (s)	Composto	Fórmula	PM	TR (min)	IR	Folhas (%)	Frutos (%)	Raízes (%)
01 (18)	α -Tujeno	C ₁₀ H ₁₆	136	13.205	929	< 0.01	0.02	0.02
02 (19)	α -Pinoeno	C ₁₀ H ₁₆	136	13.703	941	1.30	2.01	2.10
03 (20)	6-Metil-5-hepten-2-ona	C ₈ H ₁₄ O	126	14.431	958	0.02	0.54	0.56
04 (21)	Canfeno	C ₁₀ H ₁₆	136	14.448	958	0.02	0.04	0.05
05 (22)	Sabineno	C ₁₀ H ₁₆	136	15.174	975	0.50	< 0.01	< 0.01
06 (23)	Mirceno	C ₁₀ H ₁₆	136	15.407	981	1.01	3.84	4.07
07 (24)	β -Pinoeno	C ₁₀ H ₁₆	136	15.656	987	0.37	0.72	0.76
08 (25)	α -Felandreno	C ₁₀ H ₁₆	136	16.734	1007	0.01	< 0.01	< 0.01
09 (26)	δ -3-Careno	C ₁₀ H ₁₆	136	17.271	1015	< 0.01	0.03	0.03
10 (27)	α -Terpineno	C ₁₀ H ₁₆	136	17.420	1017	< 0.01	< 0.01	< 0.01
11 (28)	<i>p</i> -Cimeno	C ₁₀ H ₁₄	134	17.537	1018	0.22	0.42	0.45
12 (29)	Limoneno	C ₁₀ H ₁₆	136	18.203	1028	0.37	0.59	0.63
13 (30)	β -Felandreno	C ₁₀ H ₁₆	136	18.335	1030	0.04	0.08	0.09
14 (31)	<i>cis</i> -Ocimeno	C ₁₀ H ₁₆	136	18.655	1034	< 0.01	0.02	0.02
15 (32)	γ -Terpineno	C ₁₀ H ₁₆	136	20.021	1053	0.01	0.02	0.02
16 (33)	(Z)-Óxido de linalol	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	170	20.791	1064	< 0.01	0.21	0.21
17 (34)	<i>p</i> -Cimeneno	C ₁₀ H ₂₂	132	22.000	1081	< 0.01	0.03	0.03
18 (35)	Linalol	C ₁₀ H ₁₈ O	154	22.379	1086	0.06	0.19	0.19
19 (36)	α -Camfolenal	C ₁₀ H ₁₆ O	152	24.471	1120	< 0.01	0.20	0.21
20 (37)	<i>trans</i> -Pinocarveol	C ₁₀ H ₁₆ O	152	25.778	1143	0.02	0.14	0.14
21 (38)	<i>trans</i> -Verbenol	C ₁₀ H ₁₆ O	152	25.832	1144	0.01	0.13	0.13
22 (39)	Pinocarvone	C ₁₀ H ₁₄ O	150	26.620	1158	< 0.01	0.03	0.03
23 (40)	<i>p</i> -Cimen-8-ol	C ₁₀ H ₁₄ O	150	27.342	1172	< 0.01	0.01	0.01
24 (41)	Terpinen-4-ol	C ₁₀ H ₁₈ O	154	27.643	1177	< 0.01	0.08	0.02
25 (42)	α -Terpineol	C ₁₀ H ₁₈ O	154	28.085	1185	< 0.01	0.03	0.05
26 (43)	Mirtenal	C ₁₀ H ₁₄ O	150	28.176	1187	0.03	0.02	0.03
27 (44)	Mirtenol	C ₁₀ H ₁₆ O	152	28.423	1191	0.02	0.03	0.04
28 (45)	Verbenona	C ₁₀ H ₁₄ O	150	28.718	1196	< 0.01	0.05	0.06
29 (46)	<i>trans</i> -Carveol	C ₁₀ H ₁₆ O	152	29.150	1206	< 0.01	0.03	0.05
30 (47)	Nerol (<i>cis</i> -geraniol)	C ₁₀ H ₁₈ O	154	29.508	1215	0.01	0.04	0.06
31 (48)	<i>p</i> -Anisalaldeído	C ₈ H ₈ O ₂	136	29.961	1227	< 0.01	0.06	0.02
32 (49)	Carvone	C ₁₀ H ₁₄ O	150	30.066	1229	0.01	0.05	0.01
33 (50)	<i>trans</i> -Geraniol	C ₁₀ H ₁₈ O	154	30.424	1238	0.05	0.06	0.07
34 (51)	Piperitona	C ₁₀ H ₁₆ O	152	30.615	1243	0.06	0.02	0.05
35 (52)	Geranial (α -citral)	C ₁₀ H ₁₆ O	152	30.829	1249	< 0.01	0.01	0.01
36 (53)	N decanol	C ₁₆ H ₃₂ O	256	31.093	1256	< 0.01	0.07	0.01
37 (54)	α -Terpinen-7-al	C ₁₀ H ₁₄ O	150	31.307	1261	0.06	0.50	0.01
38 (55)	<i>cis</i> -Verbenil acetato	C ₁₂ H ₁₈ O ₂	194	31.425	1264	< 0.01	0.01	0.01

39 (56)	Indol	C ₈ H ₇ N	117	31.471	1265	< 0.01	0.01	0.01
40 (57)	<i>p</i> -Cimen-7-ol	C ₁₀ H ₁₄ O	150	31.716	1271	0.06	0.01	0.02
41 (58)	Timol	C ₁₀ H ₁₄ O	150	32.012	1279	0.07	0.01	< 0.01
42 (59)	Perila álcool	C ₁₀ H ₁₆ O	152	32.329	1287	< 0.01	0.01	< 0.01
43 (60)	N tridecano	C ₁₃ H ₂₈	184	32.861	1301	0.07	0.02	< 0.01
44 (61)	Piperonal	C ₈ H ₆ O ₃	150	33.000	1305	< 0.01	0.03	< 0.01
45 (62)	δ -Elemeno	C ₁₅ H ₂₄	204	34.439	1351	< 0.01	0.60	0.10
46 (63)	α -Cubebeno	C ₁₅ H ₂₄	204	34.886	1366	0.48	0.28	0.30
47 (64)	Isoledeno	C ₁₅ H ₂₄	204	35.593	1388	< 0.01	< 0.01	< 0.01
48 (65)	α -Ilangeno	C ₁₅ H ₂₄	204	35.714	1392	< 0.01	< 0.01	< 0.01
49 (66)	Ciclosativeno	C ₁₅ H ₂₄	204	35.782	1394	< 0.01	0.03	0.04
50 (67)	α -Copaeno	C ₁₅ H ₂₄	204	35.858	1397	4.41	3.69	3.86
51 (68)	β -Elemeno	C ₁₅ H ₂₄	204	36.108	1405	0.95	1.28	1.35
52 (69)	β -Bourboneno	C ₁₅ H ₂₄	204	36.185	1408	< 0.01	0.18	0.18
53 (70)	Longifoleno	C ₁₅ H ₂₄	204	36.854	1432	0.12	0.03	0.09
54 (71)	α -Gurjuneno	C ₁₅ H ₂₄	204	36.977	1436	0.59	0.41	0.43
55 (72)	β -Cariofileno	C ₁₅ H ₂₄	204	37.276	1447	12.61	3.07	3.21
56 (73)	<i>epi</i> -biciclosesquifelandreno	C ₁₅ H ₂₄	204	37.468	1454	0.88	0.35	0.35
57 (74)	β -Gurjuneno	C ₁₅ H ₂₄	204	37.732	1463	1.49	0.79	0.83
58 (75)	Aromadendreno	C ₁₅ H ₂₄	204	37.880	1468	0.14	0.11	0.12
59 (76)	α -Humuleno	C ₁₅ H ₂₄	204	38.250	1482	0.31	0.57	0.76
60 (77)	Aloaromadendreno	C ₁₅ H ₂₄	204	38.475	1490	3.15	2.97	3.11
61 (78)	γ -Muroloeno	C ₁₅ H ₂₄	204	38.596	1494	2.51	0.32	0.34
62 (79)	Germacreno D	C ₁₅ H ₂₄	204	38.815	1501	0.19	0.47	0.49
63 (80)	γ -Cadineno	C ₁₅ H ₂₄	204	38.915	1505	0.21	0.59	0.62
64 (81)	Valenceno	C ₁₅ H ₂₄	204	39.197	1515	0.21	0.15	0.15
65 (82)	<i>epi</i> -Cubebol	C ₁₅ H ₂₆ O	222	39.230	1517	0.33	1.17	1.21
66 (83)	Viridifloreno (ledeno)	C ₁₅ H ₂₄	204	39.316	1520	0.38	0.22	0.27
67 (84)	α -Selineno	C ₁₅ H ₂₄	204	39.388	1523	0.83	0.46	0.47
68 (85)	<i>cis</i> -Calameneno	C ₁₅ H ₂₂	202	39.705	1534	0.10	0.12	0.13
69 (86)	δ -Cadineno	C ₁₅ H ₂₄	204	39.777	1537	3.74	3.90	4.16
70 (87)	(<i>E</i>)-Nerolidol	C ₁₅ H ₂₆ O	222	40.278	1555	8.18	9.14	10.33
71 (88)	Elemol	C ₁₅ H ₂₆ O	222	40.396	1559	0.48	0.82	0.85
72 (89)	Ledol	C ₁₅ H ₂₆ O	222	41.425	1597	0.19	0.76	0.70
73 (90)	Espatuleno	C ₁₅ H ₂₄ O	220	41.609	1603	8.59	17.37	17.83
74 (91)	Globulol	C ₁₅ H ₂₆ O	222	41.813	1610	0.44	0.44	0.43
75 (92)	Óxido de Cariofileno	C ₁₅ H ₂₄ O	220	41.949	1614	7.37	5.77	6.41
76 (93)	Viridiflorol	C ₁₅ H ₂₆ O	222	42.637	1636	2.75	7.38	7.53
77 (94)	Cubeno	C ₁₅ H ₂₆ O	222	43.104	1651	2.19	2.35	1.94
77	Total identificado					68.22	75.77	78.87

TR – tempo de retenção; IR – índice de retenção (dados experimentais). Coluna não polar (CP-SIL PONA CB)
 PM – peso molecular / n – n° de voláteis identificados / (s) – n° da substância identificada

Os componentes majoritários do óleo das raízes foram espatulenol (17,83 %), (*E*)-nerolidol (10,33 %), viridiflorol (7,53 %), óxido de cariofileno (6,41 %), δ -cadineno (4,16 %), mirceno (4,07 %), α -copaeno (3,86 %), β -cariofileno (3,21 %), aloaromadendreno (3,11 %) e α -pineno (2,10 %). O óleo dos frutos foi caracterizado por seus altos conteúdos de espatulenol (17,37 %), (*E*)-nerolidol (9,14 %), viridiflorol (7,38 %), óxido de cariofileno (5,77 %), δ -cadineno (3,90 %), mirceno (3,84 %), α -copaeno (3,69 %), β -cariofileno (3,07 %), aloaromadendreno (2,97 %) e α -pineno (2,01 %). Os principais constituintes do óleo das folhas foram β -cariofileno (12,61 %), espatulenol (8,59 %), (*E*)-nerolidol (8,18 %), óxido de cariofileno (7,37 %), α -copaeno (4,41 %), δ -cadineno (3,74 %), aloaromadendreno (3,15 %), viridiflorol (2,75 %) e γ -muroleno (2,51 %). É importante esclarecer que algumas destas substâncias voláteis apresentam atividades biológicas notáveis, dentre as quais podem-se mencionar o β -cariofileno, com atividade espasmolítica, anestésica local e antiinflamatória; globulol, com propriedade fungistática e espatulenol, com propriedades antibacterianas e moderada atividade citotóxica contra células do tipo KB (LIMBERGER et al., 2004).

Vários constituintes voláteis não foram identificados, contudo foram detectadas nestes óleos algumas substâncias descritas como constituintes de óleos essenciais de *O. anisum* e *O. corcovadensis* (SANTOS et al., 2001; FACUNDO et al., 2004). A análise comparativa dos óleos mostrou variabilidade na constituição química dos componentes majoritários nos diferentes órgãos analisados. As substâncias presentes nestes óleos indicaram a preferência da

Ottonia em sintetizar sesquiterpenos, tendo como precursor fundamental o *E,E*-farnesil-PP (SANTOS et al., 2001).

No presente trabalho revelou-se com detalhes, pela primeira vez, a composição dos óleos das raízes, folhas e frutos de *O. martiana*.

4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

4.4.1 Microbiota Oral Humana

O EBEtOH dos órgãos totais de *O. martiana*, nas concentrações testadas, apresentou atividade antimicrobiana sobre o crescimento de bactérias Gram-positivas da microbiota oral humana e dos patógenos nosocomiais, porém, frente às espécies Gram-negativas, o mesmo somente apresentou potencial antimicrobiano contra *Serratia marcescens*. Contudo, como o método de difusão em ágar foi utilizado somente como teste preliminar qualitativo, pois apresenta limitações para substâncias com baixa difusibilidade no meio de cultura, o maior halo de inibição não foi considerado uma ação mais efetiva do EBEtOH (MAURICE et al., 1965). Diante disso, a possibilidade de existir no EBEtOH substâncias antimicrobianas frente a bactérias Gram-negativas não foi excluída.

Para confirmar os resultados obtidos no ensaio por difusão em ágar (discos e poços) e de direcionar o isolamento dos constituintes bioativos, empregou-se a bioautografia, um método simples, rápido, confiável e conveniente para testar efeitos antimicrobianos de extratos de plantas e de substâncias puras (HOSTETTMANN, 1998). As zonas de inibição presentes nos bioautogramas

confirmaram os resultados obtidos nos ensaios por difusão em ágar com discos e poços. Além disso, o método de bioautografia permitiu detectar atividade antimicrobiana no EBEtOH das raízes e FHex, devido à ocorrência de várias zonas de inibição nos ensaios frente às bactérias Gram-positivas testadas, indicando a presença de várias substâncias bioativas. Zonas de inibição também foram observadas na FClor contra *S. saprophyticus*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. mutans*, *S. mitis*, *S. pyogenes* e *Serratia marcescens*. Na análise dos bioautogramas ensaiados contra *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. mutans*, *S. mitis*, *S. pyogenes*, *S. salivarius* e *Serratia marcescens*, foi verificado que o EBEtOH, FHex e piperovatina apresentaram zonas de inibição com *Rfs* similares a 0,35 e/ou 0,52. Cabe esclarecer que pela raspagem das cromatoplasmas nas zonas com *Rfs* similares às zonas biotivas, e análise das mesmas por CG-EM, foi possível revelar a identidade das substâncias bioativas piperovatina, piperlonguminina e isopiperlonguminina. O ensaio antibacteriano bioautográfico guiou o particionamento do EBEtOH dos frutos desta espécie vegetal, assim como o isolamento da piperovatina, substância previamente isolada das raízes e partes aéreas de *O. martiana* (LOPES, 1989; CUNICO, 2001), mas nunca exclusivamente de seus frutos. Também cabe ressaltar que na literatura científica não há registros atribuindo à esta espécie vegetal propriedade antimicrobiana sobre a microbiota oral humana, logo, esta é a primeira vez que se revela este potencial. Estudo bioautográfico realizado anteriormente por CUNICO et al. (2003a), com 3 µL de EBEtOH dos órgãos totais da *O. martiana* (20,5 mg mL⁻¹) frente a *S. aureus* (ATCC 6538) e *S. epidermidis* (ATCC 12228), permitiu evidenciar um potencial antibacteriano contra *S. aureus*, devido à detecção de

zonas de inibição de crescimento bacteriano. Frente a *S. epidermidis*, zonas de inibição não foram verificadas. A concentração inferior do extrato testado em relação ao do EBEtOH empregado neste trabalho, sugere menor quantidade de substâncias bioativas no extrato, o que pode explicar tal efeito.

Os resultados obtidos no bioensaio frente aos microrganismos da microbiota oral humana encontram-se inseridos na Tabela 14, a seguir.

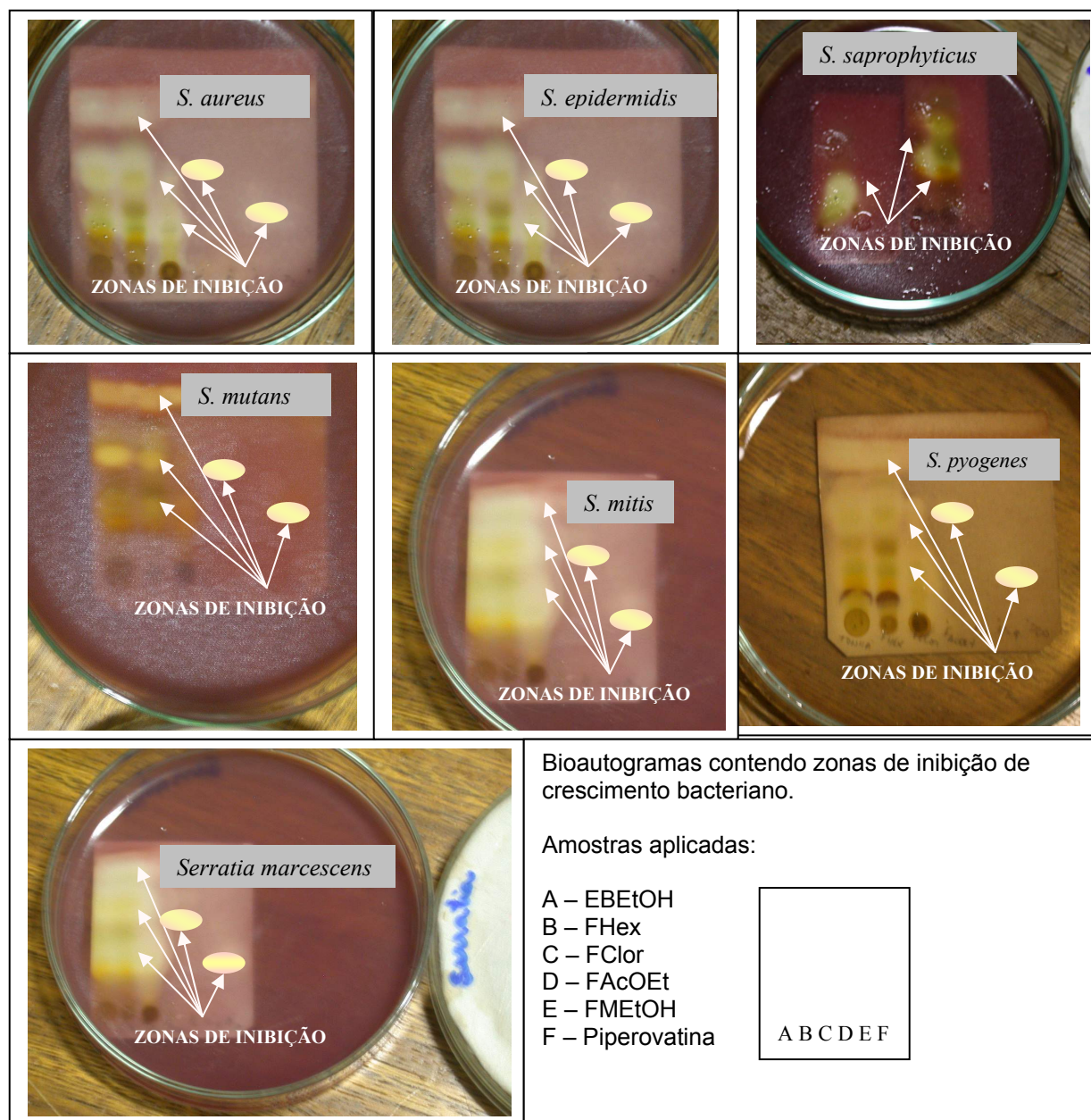
TABELA 14– RESULTADOS DA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA POR DIFUSÃO EM ÁGAR DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO DE *Ottonia martiana* (32,9 mg mL⁻¹)

Cepas e Isolados Clínicos de Bactérias	Gram	Halos de inibição (mm)				Zonas de Inibição (Ocorrência)
		Cavidade		Discos de papel		Bioautografia
		EBEtOH (1645 µg)	Digluconato Clorexidina (0,2%)	EBEtOH (329 µg)	Cloranfenicol (30 µg)	
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	positivo	12	18	08	20	+
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12228)	positivo	12	18	08	20	+
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> (isolado clínico)	positivo	09	17	07	21	+
<i>Streptococcus mitis</i> (ATCC 49456)	positivo	12	18	09	20	+
<i>Streptococcus mutans</i> (ATCC 27175)	positivo	12	18	09	20	+
<i>Streptococcus pyogenes</i> (ATCC 19615)	positivo	11	18	07	20	+
<i>Streptococcus salivarius</i> (ATCC 25975)	positivo	10	18	07	20	+
<i>Serratia marcescens</i> (isolado clínico)	negativo	12	12	08	22	+
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	negativo	-	15	-	24	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	negativo	-	-	-	06	-
<i>Enterobacter aerogenes</i> (ATCC 13048)	negativo	-	12	-	12	-
<i>Salmonella choleraesuis</i> (ATCC 10708)	negativo	-	12	-	23	-
<i>Salmonella typhimurium</i> (ATCC 14028)	negativo	-	12	-	23	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (isolado clínico)	negativo	-	20	-	28	-
<i>Proteus mirabilis</i> (isolado clínico)	negativo	-	12	-	08	-

+ presença de halos de inibição / - ausência de halos de inibição.

Os bioautogramas que exibiram zonas de inibição de crescimento bacteriano podem ser visualizados na Figura 51, a seguir.

FIGURA 51 – BIOAUTOGRAMAS EXIBINDO ZONAS DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO BACTERIANO



FONTE: AUTORA (2006)

4.4.2 Microrganismos Relacionados a Infecções Nosocomiais

Os resultados obtidos no ensaio por difusão em ágar (discos de papel e bioautografia) frente aos microrganismos relacionados às infecções nosocomiais (*Enterococcus faecium*, *Enterobacter aerogenes* e *Pseudomonas aeruginosa*) encontram-se inseridos na Tabela 15.

TABELA 15 - MEDIDAS DOS HALOS DE INIBIÇÃO (mm) DOS EXTRATOS BRUTOS ETANÓLICOS (EBEtOH) DAS RAÍZES E PARTES AÉREAS DE *Ottonia martiana* CONTRA *Enterococcus faecium* (ATCC 6569), *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048) E *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442).

Amostra	Halo de inibição (mm)		
	<i>E. faecium</i> (Gram +)	<i>E. aerogenes</i> (Gram -)	<i>P. aeruginosa</i> (Gram -)
EBEtOH	4	0	0
Controle Cloranfenicol	9	7	2
Crescimento Bacteriano	+	+	+

+ Crescimento bacteriano

Medida dos halos de inibição = medida do diâmetro do halo total – medida do diâmetro do disco

Os resultados obtidos no ensaio por bioautografia indicaram a presença de substâncias bioativas no EBEtOH de *O. martiana* frente a *E. faecium*, devido à presença de 2 zonas de inibição de crescimento bacteriano, com os respectivos Rfs de 0,76 e 0,86 (Tabela 16).

TABELA 16 - VALORES DE R_f DAS ISOBUTILAMIDAS ISOLADAS DE *Ottonia martiana* E DAS ZONAS DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO BACTERIANO NO BIOAUTOGRAMA OBTIDO PARA O EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DE RAÍZES E PARTES AÉREAS DA ESPÉCIE FRENTE A *Enterococcus faecium* (ATCC 6569).

AMOSTRAS	Valores de R_f
	Sistema eluente <i>n</i> -hexano:acetato de etila (70:30)
EBEtOH	0,76 e 0,86
Piperovatina	0,35
Piperlonguminina	0,52
Isopiperlonguminina	0,52

Nos ensaios frente a *E. aerogenes* e *P. aeruginosa* não se observaram zonas de inibição de crescimento microbiano, confirmando, desta forma, os resultados obtidos no ensaio por difusão em ágar (discos e poços). Os valores de R_f das zonas de inibição de crescimento obtidos neste ensaio não foram coincidentes com aqueles das amidas isoladas nesta espécie vegetal, sugerindo que não se pode atribuir às amidas piperovatina, piperlonguminina e isopiperlonguminina, a atividade antimicrobiana evidenciada. Contudo, não se descartou a possibilidade da existência de outros ativos poucos solúveis no meio empregado neste experimento.

4.4.3 Potencial Antimicrobiano dos Óleos Essenciais

O ensaio de bioautografia permitiu detectar e identificar alguns voláteis bioativos dos óleos de *O. martiana* frente às bactérias Gram-positivas testadas (Tabela 17).

TABELA 17 – ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS EXTRAÍDOS DE *Ottonia martiana* SOBRE QUATRO ESPÉCIES DE BACTÉRIAS.

Microrganismos	Gram	Zona de Inibição (ZI) (Bioautografia)					
		folhas 3µL		frutos 3µL		raízes 3µL	
		ZI	R _f s	ZI	R _f s	ZI	R _f s
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	Positivo	+	0.29	+	0.29	+	0.29
		+	0.34	+	0.34	+	0.34
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12228)	Positivo	+	0.29	+	0.29	+	0.29
		+	0.34	+	0.34	+	0.34
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	Negativo	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	Negativo	-	-	-	-	-	-

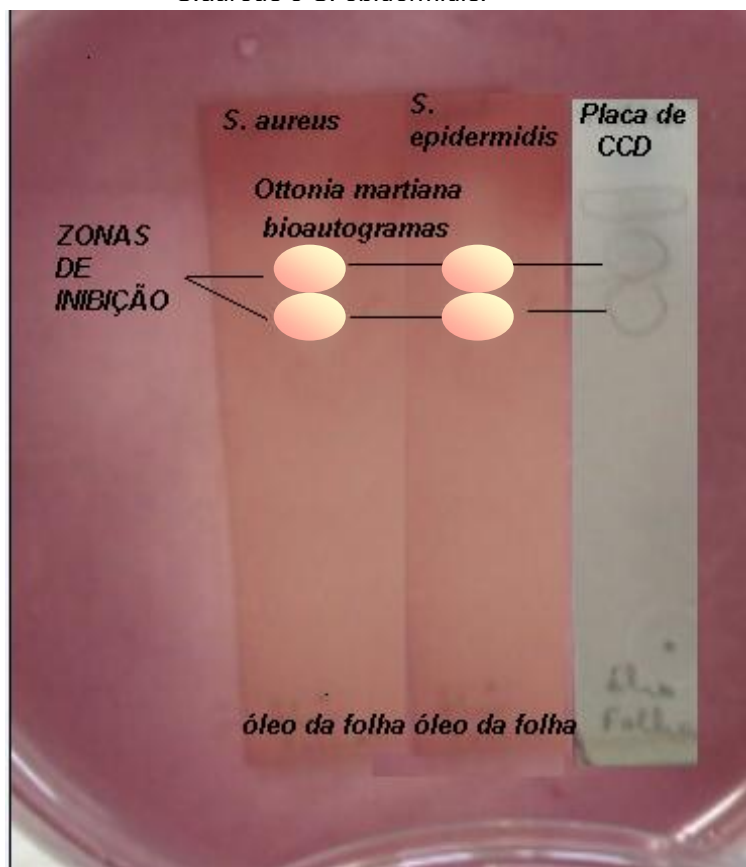
ATCC (American Type Culture Collection); + = zona de inibição; - = não zona de inibição.

O método bioautográfico direcionou o isolamento dos compostos bioativos os quais foram identificados como α -pineno (R_f 0,29), β -pineno (R_f 0,29), mirceno (R_f 0,29), α -copaeno (R_f 0,34), β -cariofileno (R_f 0,34) e δ -cadineno (R_f 0,34). A zona de inibição com R_f 0,34 também continha pequenas quantidades de α -cubebeno, β -elemeno, valenceno, α -gurjuneno, epibiciclosesquifelandreno e germacreno D.

A composição de cada zona de inibição foi caracterizada por meio de CG-EM após raspagem das zonas de inibição nas respectivas cromatoplasas.

As zonas de inibição supracitadas podem ser visualizadas nos bioautogramas inseridos na Figura 52, a seguir.

FIGURA 52 – BIOAUTOGRAFIA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Ottonia martiana* FRENTE A *S.aureus* e *S. epidermidis*.



FONTE: AUTORA (2006)

É importante lembrar que algumas das substâncias voláteis presentes nas zonas de inibição exibidas na Figura 52 já foram citadas na literatura como antimicrobianos naturais, dos quais pode-se mencionar o espatulenol, α -pineno, β -pineno, mirceno, copaeno e δ -cadineno (LIMBERGER et al., 2004).

4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

4.5.1 Influência do EBEtOH sobre o Crescimento Micelial

O bioensaio da influência do EBEtOH dos órgãos totais sobre o crescimento micelial dos fitopatógenos mostrou que tanto o EBEtOH autoclavado quanto o EBEtOH filtrado (0,22 μ m), inibiram o crescimento micelial do *C. spathulatum* e *B. cinerea* na concentração de 1000 ppm. O mesmo não foi verificado nas outras concentrações ensaiadas (Tabela 18).

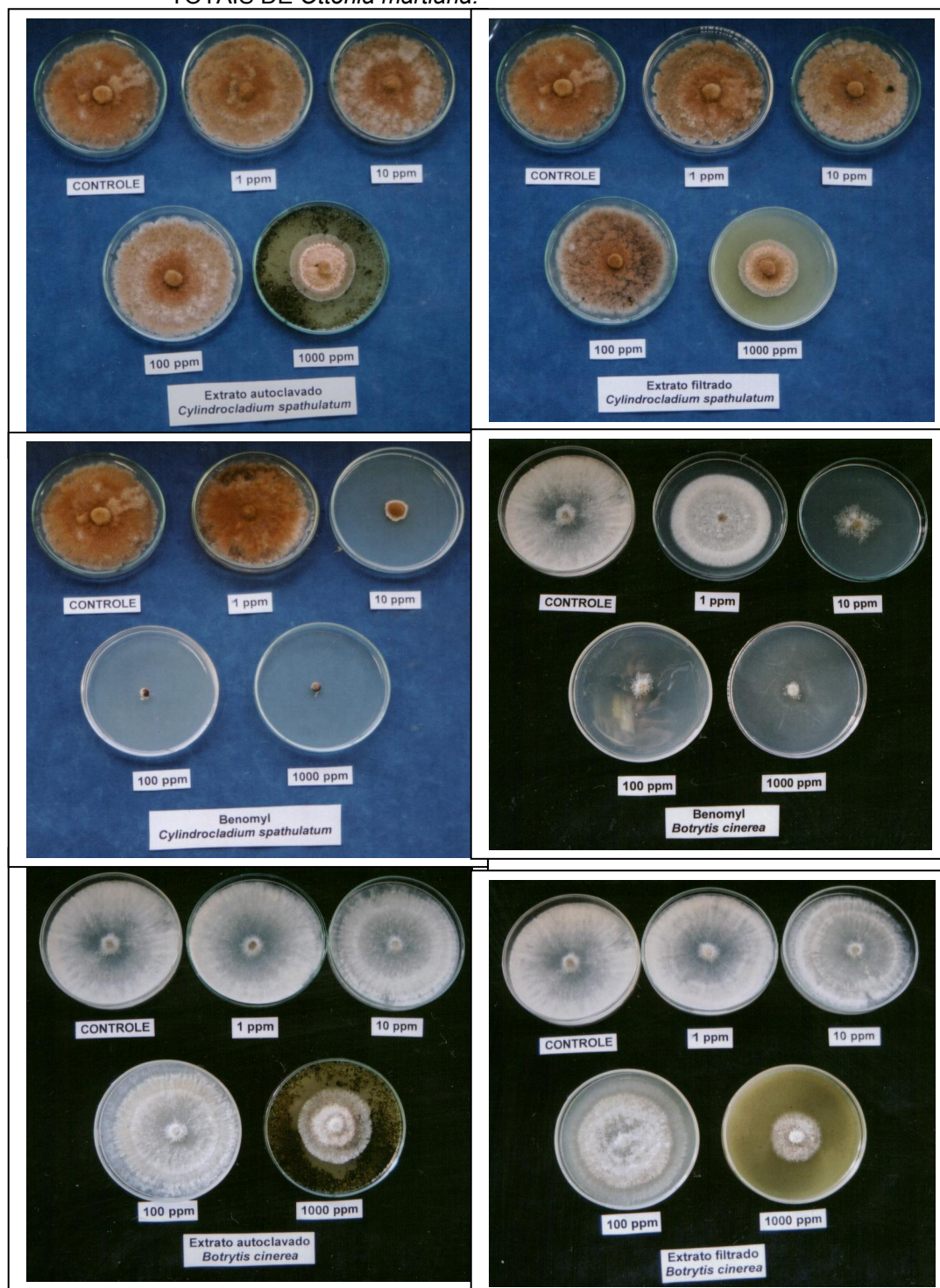
TABELA 18 – INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO MICELIAL (%) DE *Cylindrocladium spathulatum* E *Botrytis cinerea* QUANDO TESTADOS *IN VITRO* COM EXTRATO BRUTO ETANÓLICO (AUTOCLAVADO OU FILTRADO) DE *Ottonia martiana*

<i>C. spathulatum</i>	1 ppm % inibição	10 ppm % inibição	100 ppm % inibição	1000 ppm % inibição
Benomyl	- 2,15a	87,62b	100,00c	100,00c
EBEtOH autoclavado	- 2,02a	0,59a	2,02b	43,58c
EBEtOH filtrado	4,63a	15,44b	5,80a	52,83d
<i>B. cinerea</i>				
Folicur	18,93a	75,71b	84,05b	92,74c
EBEtOH autoclavado	0,00a	0,00a	0,00a	45,60b
EBEtOH filtrado	0,00a	0,00a	0,00a	68,93b

Médias seguidas de mesma letra, nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 95% de significância

O crescimento micelial das colônias fúngicas podem ser melhor visualizadas na Figura 53.

FIGURA 53 – CRESCIMENTO MICELIAL DO *Cylindrocladium spathulatum* e *Botrytis cinerea* FRENTE AO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO DOS ÓRGÃOS TOTAIS DE *Ottonia martiana*.



FONTE: AUTORA (2006)

Os resultados da Tabela 18 mostraram o potencial antifúngico do EBEtOH de *O. martiana* frente aos fungos causadores da pinta-preta e do mofo cinzento. Além disso, permitiram evidenciar que o efeito inibidor deste extrato foi maior frente ao fitopatógeno *B. cinerea* (68,92%). Ademais, pelo exposto na Figura 53 verificou-se que o EBEtOH filtrado (0,22 µm) apresentou maior atividade que o EBEtOH autoclavado frente aos 2 fitopatógenos testados (*C. spathulatum*: 52,83% e 43,58%, *B. cinerea*: 68,93% e 43,60%, respectivamente). Isto pode ser explicado a partir da análise cromatográfica (CLAE) realizada por CUNICO (2001), que comprovou a ocorrência de hidrólise de alguns constituintes de um extrato desta espécie vegetal ao ser autoclavado, contudo, permitiu verificar que as amidas piperovatina e isopiperlonguminina não sofreram decomposição.

É importante esclarecer que a doença pinta-preta (mancha da folha da erva-mate) é causada pelo fitopatógeno *C. spathulatum*, e traz severos prejuízos, tanto no viveiro quanto no campo, levando até 30% de perda das mudas (CUNICO et al., 2002).

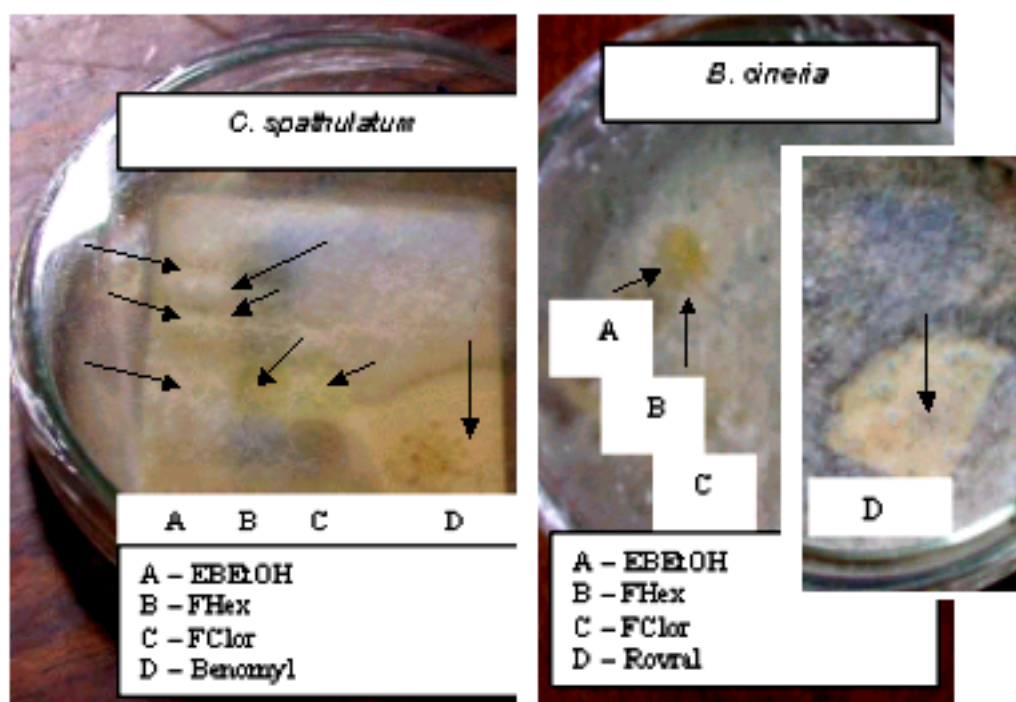
O mofo cinzento causado pelo fungo *Botrytis cinerea*, ocorre em diversas culturas agrícolas e florestais e constitui-se numa das principais doenças em viveiros de eucaliptos, podendo causar tombamento das mudas na fase inicial e lesões na haste e nos ponteiros, nas mudas já formadas (FERREIRA, 1989).

Diante disso, o extrato de *O. martiana* deve ser investigado com mais detalhes, a fim de se identificar os seus constituintes bioativos. Para tal, realizou-se uma investigação por bioautografia direta.

4.5.2 Bioautografia Direta

Este ensaio permitiu detectar zonas de inibição de crescimento do *C. spathulatum* (Rfs 0,2; 0,35 e 0,6) nos bioautogramas contendo EBEtOH, FHex e FClor. Frente a *B. cinerea* somente uma zona de inibição foi detectada nos bioautogramas contendo EBEtOH e FHex (Rf 0,35). Essas zonas de inibição podem ser visualizadas nos bioautogramas apresentados na Figura 54, a seguir.

FIGURA 54 – VISUALIZAÇÃO DAS ZONAS DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO FÚNGICO NOS BIOAUTOGRAMAS ENSAIADOS



FONTE: AUTORA (2006)

As zonas de inibição com diferentes Rfs sugerem a presença de vários componentes bioativos no EBEtOH desta espécie vegetal. Como na natureza a maioria das plantas são resistentes aos diferentes patógenos, e que essa

resistência pode estar relacionada à existência de fungicidas naturalmente produzidos, a descoberta de substâncias naturais com efeito fungitóxico poderá contribuir no controle de doenças de plantas tais como a pinta-preta e mofo cinzento. Sendo assim, buscou-se pela raspagem das zonas de inibição nas cromatoplasas, identificar os componentes bioativos deste extrato, por meio de CG-EM e comparação com dados de literatura, amostras autênticas e biblioteca eletrônica.

Dentre as zonas de inibição exibidas na Figura 54, somente foi possível identificar uma das substâncias bioativas presentes na zona de inibição com R_f 0,35; a qual apresentou espectro de massas compatível com aquele descrito para o isolado OMA1, identificado anteriormente como piperovatina.

4.5.3 Teste da Germinação de Esporos

Adotando-se o método bioanalítico *in vitro* de inibição de germinação de esporos, verificou-se que o EBEtOH de *O. martiana* (1000 ppm) apresenta potencial antifúngico sobre o fitopatógeno *C. spathulatum*, inibindo cerca de 50% a germinação dos esporos. Contudo, frente ao *B. cinerea*, o EBEtOH não apresentou potencial fungitóxico para inibir a germinação dos esporos, pelo contrário, este estimulou o crescimento dos mesmos (63%), quando comparado ao controle positivo de germinação (2,5%).

Os resultados obtidos neste bioensaio encontram-se apresentados na Tabela 19, a seguir.

TABELA 19 - INIBIÇÃO DA GERMINAÇÃO DE ESPOROS (%) DE *Cylindrocladium spathulatum* E *Botrytis cinerea* QUANDO TESTADOS *IN VITRO* COM EXTRATO BRUTO DE *Ottonia martiana*

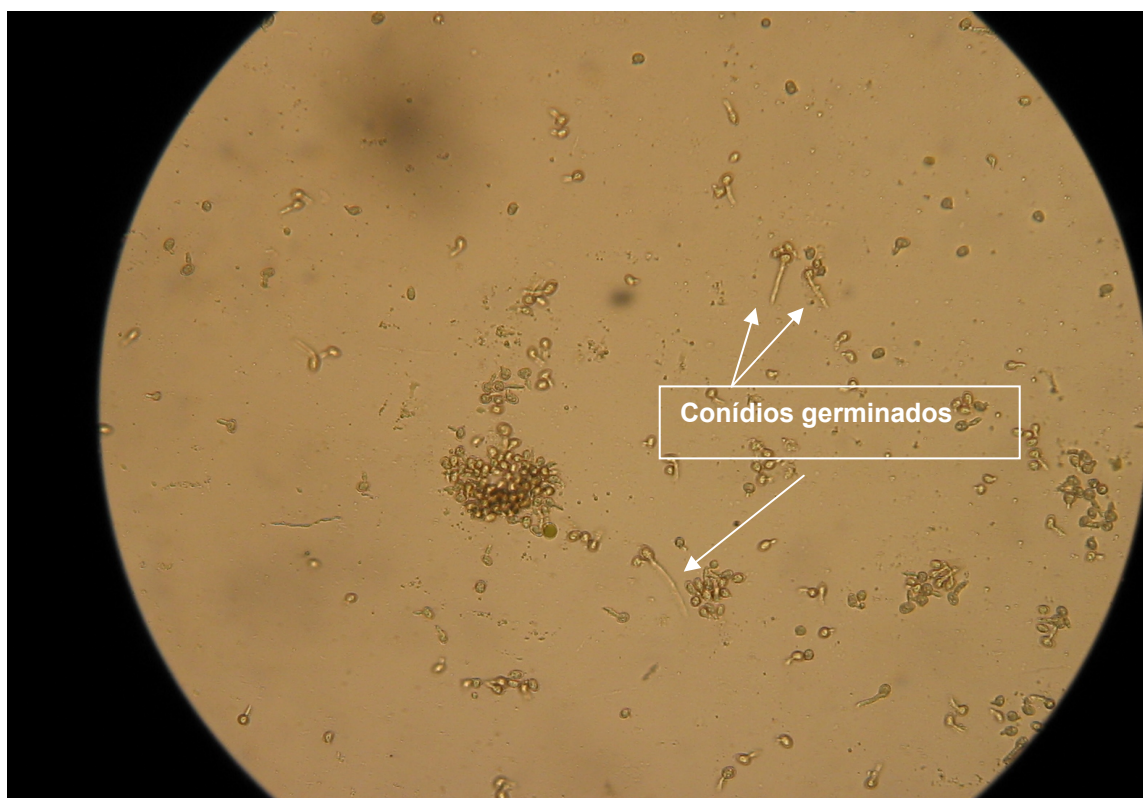
Amostra	<i>Cylindrocladium spathulatum</i>		<i>Botrytis cinerea</i>	
	% Germinação	% Inibição	% Germinação	% Inibição
EBEtOH (1000 ppm)	43,5a	56,5a	63,0a	37,0a
Controle Positivo de Germinação (Água estéril)	100,0b	0,0b	2,5b	97,5b
Controle Negativo de Germinação Benomyl/ Rovral (1000 ppm)	0,0	100,0	0,0	100,0

Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si Pelo teste de Tukey ao nível de 95% de significância/(n = 8). Foram considerados germinados aqueles tubos que se apresentassem \geq à metade do tamanho dos conídios.

O fato de existir auto-inibição de germinação entre conídios de *B. cinerea* explica a baixa porcentagem de germinação (2,5%) apresentada pelo controle positivo (água estéril), do qual na ausência de auto-inibição espera-se a ocorrência de alta porcentagem de germinação (aproximadamente 100%). Desta forma, o efeito de estímulo à germinação dos conídios de *B. cinerea* pode ser explicado pela ação do extrato na diminuição da auto-inibição existente entre os conídios deste fitopatógeno (CARDOSO FILHO, 2003). A baixa taxa de

germinação apresentada no controle positivo (2,5%) pode ser visualizada na Figura 55.

FIGURA 55 – VISUALIZAÇÃO MICROSCÓPICA DA GERMINAÇÃO DE CONÍDIOS DO *Botrytis cinerea* EM ÁGUA ESTÉRIL



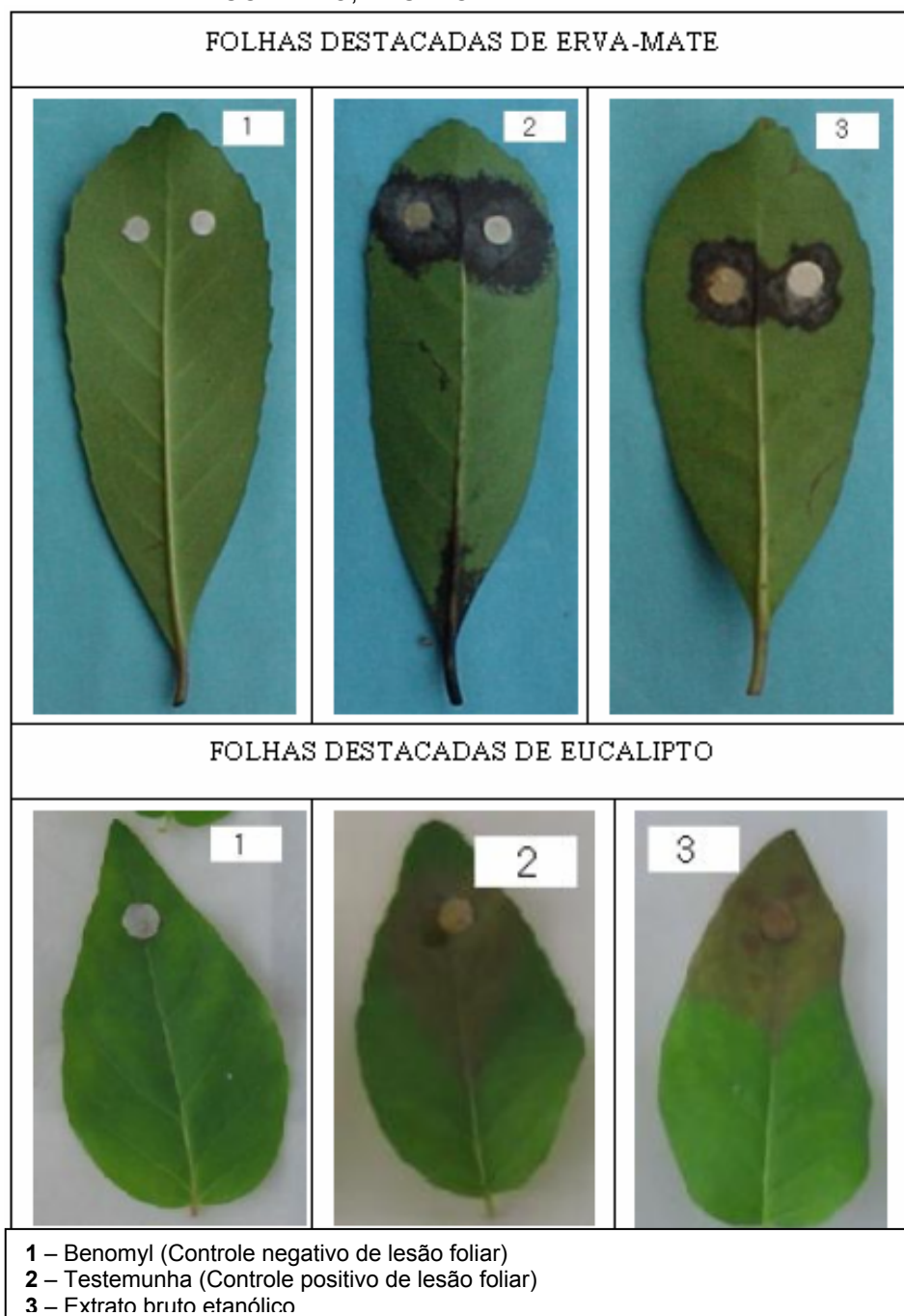
FONTE: AUTORA (2006)

4.5.4. Teste em Folhas Destacadas

O EBEtOH de *O. martiana* somente apresentou potencial antifúngico no bioensaio *in vivo* das folhas destacadas, quando testado frente ao fitopatógeno *Cylindrocladium spathulatum*, sugerindo ação inibitória tanto no desenvolvimento reprodutivo quanto no desenvolvimento vegetativo deste isolado.

Os resultados deste teste podem ser visualizados na Figura 56, a seguir.

FIGURA 56 – EFEITO DO EXTRATO DE *Ottonia martiana* FRENTE AOS FITOPATÓGENOS *Cylindrocladium spathulatum* E *Botrytis cinerea* EM FOLHAS DESTACADAS DE ERVA-MATE E EUCALIPTO, RESPECTIVAMENTE.



FONTE: AUTORA (2005)

No ensaio *in vivo* avaliou-se o efeito do EBEtOH de *O. martiana* sobre a formação de lesões foliares causadas pelo fitopatógeno *C. spathulatum* em folhas destacadas de erva-mate. Os resultados deste ensaio encontram-se inseridos na Tabela 20.

TABELA 20 – INIBIÇÃO DE LESÕES FOLIARES DO EXTRATO BRUTO (%) DE *Ottonia martiana*. CAUSADAS *IN VIVO* POR *Cylindrocladium spathulatum*

AMOSTRAS	Área média da lesão foliar	Inibição (%)
Controle de crescimento (água destilada estéril)	3.2809a	0.0
EBEtOH de <i>O. martiana</i> (1000 ppm)	1.8581b	43.37
Benomyl (1000 ppm)	0.0c	100

* Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 95% de significância/ (n = 10).

A inibição do crescimento da lesão foliar foi determinada pela equação:

$$I(\%) = [(área\ média\ da\ lesão\ do\ controle\ (água) - área\ média\ da\ lesão\ dos\ tratamentos) / (área\ média\ do\ controle\ (água))] \times 100$$

A ação do EBEtOH (1000 ppm) atuou com aproximadamente metade do poder de benomyl (1000 ppm), sugerindo que o aumento da concentração (2000 ppm) poderia simular o controle feito pelo fungicida. O efeito inibitório do EBEtOH de *O. martiana* sobre a formação de lesões foliares causadas pelo *B. cinerea* em folhas destacadas de eucalipto foi inferior ao esperado (Tabela 21), uma vez que no ensaio da influência deste extrato sobre o crescimento micelial, o potencial de

inibição de crescimento apresentado pelo mesmo foi maior do que o apresentado frente a *C. spathulatum*. Este efeito sugere que o EBEtOH testado diminuiu a auto-inibição existente entre os conídios deste fitopatógeno (CARDOSO FILHO, 2003), promovendo estímulo à germinação dos conídios, ou seja, ação estimulatória sobre o desenvolvimento reprodutivo do *B. cinerea* e atividade inibitória de crescimento micelial sobre o desenvolvimento vegetativo do mesmo.

TABELA 21 – INIBIÇÃO DE LESÕES FOLIARES (%) CAUSADAS POR *Botrytis cinerea* *IN VIVO* COM EXTRATO BRUTO DE *Ottonia martiana*

AMOSTRAS	Área média da lesão foliar	Inibição (%)
Controle de crescimento (água destilada estéril)	2.5a	0.0
EBEtOH de <i>O. martiana</i> (1000 ppm)	1.8b	28
Rovral (1000 ppm)	0.0c	100

* Média de dez folhas - Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 95% de significância.

4.5.5 Teste em Mudras de Erva-mate e Eucalipto

Os sintomas apresentados pelas mudras no bioensaio *in vivo* após 10 dias da inoculação dos fungos mostraram que o EBEtOH dos órgãos totais, na concentração de 1000 ppm, não apresentou potencial para o controle das fitopatologias testadas. Entretanto, a existência de potencial antifúngico do EBEtOH desta espécie vegetal em uma concentração maior que a ensaiada não foi descartada, visto o mesmo ser constituído por inúmeras substâncias..

Os resultados obtidos neste ensaio encontram-se disponíveis na Tabela 22, a seguir.

TABELA 22 – SINTOMAS APRESENTADOS PELAS MUDAS DE ERVA-MATE E DE EUCALIPTO TRATADAS COM EXTRATO BRUTO ETANÓLICO DE *Ottonia martiana*.

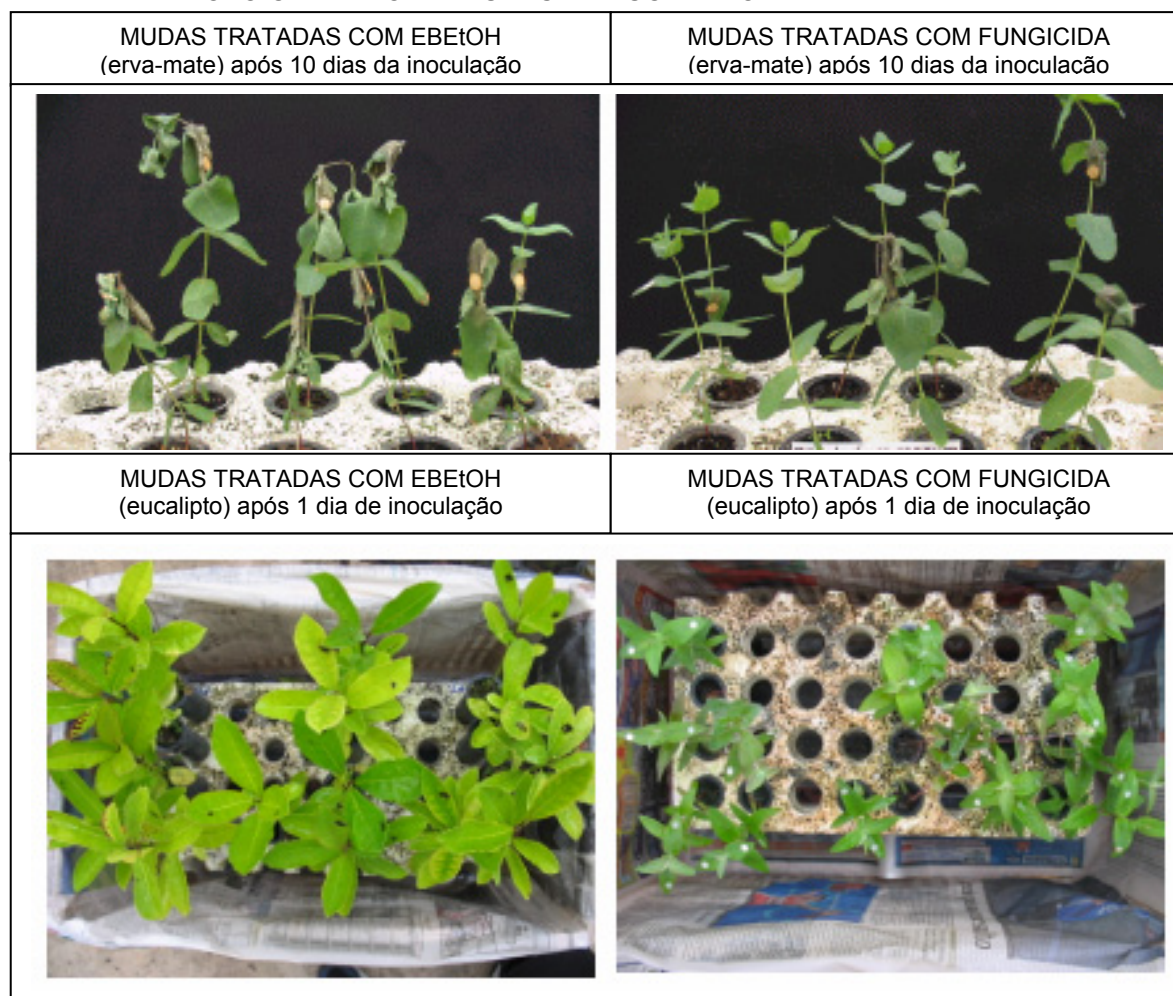
PATÓGENOS	Número de folhas inoculadas	Número de folhas com sintomas	% Infecção	% Inibição
<i>C. spathulatum:</i>	Erva-mate			
Benomyl	10	1a	10	90
EBEtOH	10	8b	80	20
Controle	10	9c	90	10
<i>B. cinerea:</i>	Eucalipto			
Rovral	10	1a	10	90
EBEtOH	10	10b	100	00
Controle	10	9c	90	10

*Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 95% de significância/ (n = 10)

As mudas de erva-mate tratadas previamente com EBEtOH da *O. martiana* apresentaram um elevado índice de infecção (80%), quando comparadas com as testemunhas inoculadas (90%), indicando baixo potencial para o controle da pinta-preta (20%). Por outro lado, as mudas de eucalipto previamente tratadas com o EBEtOH, apresentaram índice de infecção (100%) maior que o das testemunhas inoculadas (90%), indicando que o EBEtOH não apresenta potencial para o controle do mofo cinzento, porém potencial para estimular o

desenvolvimento do mesmo (mofo cinzento). Parte dos resultados obtidos no bioensaio em mudas de erva-mate pode ser visualizada na Figura 57.

FIGURA 57 – EFEITO ANTIFÚNGICO DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO (EBEtOH) DE *Ottonia martiana* NO CONTROLE DA PINTA PRETA EM MUDAS DE ERVA-MATE E DO MOFO CINZENTO EM MUDAS DE EUCALIPTO.



FONTE: AUTORA (2006)

Os resultados deste bioensaio indicam que o controle alternativo natural da pinta-preta em erva-mate, assim como do mofo cinzento em eucalipto não é uma alternativa viável, num sistema de controle alternativo, quando se utiliza EBEtOH de *O.martiana* na concentração de 1000 ppm. Em contrapartida, os resultados dos ensaios *in vitro* sugerem que o EBEtOH da *O. martiana* tem maior

ação sobre o desenvolvimento vegetativo destes fitopatógenos do que sobre o desenvolvimento reprodutivo dos mesmos. Sendo assim, o potencial antifúngico deste extrato sobre o desenvolvimento vegetativo dos fitopatógenos ensaiados deve ser melhor investigado, visando-se identificar os constituintes bioativos do mesmo.

A conscientização química sobre os prejuízos causados aos ecossistemas e ao homem pelo uso indiscriminado e incorreto de defensivos agrícolas no ambiente rural e urbano, aliado aos resultados obtidos no presente trabalho, incentivam a realização de estudos complementares com concentrações superiores a 1000 ppm, levando-se em consideração que as substâncias bioativas dos mesmos podem ser dose-dependentes.

4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA

No teste de germinação de sementes, como mostra a Tabela 23, observou-se que as soluções-teste (EBEtOH, piperovatina, isopiperlonguminina e mistura piperovatina e isopiperlonguminina) não apresentaram, nas concentrações testadas, influência sobre a germinabilidade da *L. sativa* (percentual final da germinação), porém promoveram um atraso na germinação das mesmas. Isto corrobora com o fato de que o efeito alelopático muitas vezes não é percebido sobre a taxa de germinação, que indica o percentual final de germinação no tempo, mas sobre a velocidade de germinação, que indica o tempo necessário para a germinação, ou sobre outro parâmetro do processo (FERREIRA; BORGUETHI, 2004).

TABELA 23 – Percentagem de germinação (G), inibição de germinação (IG), crescimento (C) e de inibição de crescimento (IC) das plântulas de *Lactuca sativa*, observadas nos bioensaios submetidos a diferentes concentrações do extrato bruto etanólico e substâncias isoladas das raízes de *Ottonia martiana* Miq., Piperaceae.

Amostras	(mg / mL)	G (%)	IG (%)	Hipocótilos			Radículas		
				C (mm)	C (%)	IC (%)	C (mm)	C (%)	IC (%)
Extrato Bruto (raízes) (EBEtOH)	0,8	97,5	2,5	24,76 b	83,76	16,24	11,98 b	87,70	12,30
	0,4	100,0	0,0	15,46 a	52,30	47,70	7,56 a	55,34	44,66
	0,2	97,5	2,5	21,70 b	73,41	26,59	9,50 a	69,54	30,46
	0,1	97,5	2,5	13,20 a	44,65	55,35	8,58 a	62,81	37,19
	T			29,56 c			13,66 c		
Piperovatina	0,8	97,5	2,5	26,42 b	89,37	10,63	12,04 a	88,14	11,86
	0,4	100,0	0,0	28,98 c	98,03	1,97	13,18 ab	96,48	3,52
	0,2	100,0	0,0	30,38 c	102,77	-2,77	10,98 a	80,38	19,62
	0,1	100,0	0,0	23,14 a	78,28	21,72	12,00 a	87,84	12,16
	T			29,56 c			13,66 b		
Isopiperlonguminina	0,8	97,5	2,5	27,42 a	78,43	21,57	15,44 b	71,28	28,72
	0,4	100,0	0,0	33,78 ab	96,62	3,38	20,30 c	93,72	6,28
	0,2	97,5	2,5	32,30 ab	92,39	7,61	16,96 b	78,30	21,70
	0,1	100,0	0,0	28,82 a	82,43	17,57	13,58 a	62,69	37,31
	T			34,96 b			21,66 c		
Mistura das amidas piperovatina e isopiperlonguminina	0,8	97,5	2,5	18,96 b	54,23	45,77	19,18 c	88,55	11,45
	0,4	97,5	2,5	16,60 a	47,48	52,52	15,98 b	73,77	26,23
	0,2	100,0	0,0	19,32 b	55,26	44,74	12,14 a	56,04	43,96
	0,1	100,0	0,0	19,22 b	54,97	45,03	16,10 b	74,33	25,67
	T			34,96 c			21,66 d		

Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância - T (Testemunha)

No bioensaio para o potencial alelopático sobre o desenvolvimento das plântulas de *L. sativa* verificou-se que o EBEtOH, nas concentrações testadas, produziu efeitos inibitórios sobre o crescimento das radículas (12,30 a 44,66%) e dos hipocótilos (16,24 a 55,35%). Estes resultados demonstram a influência do extrato de *O. martiana* sobre o desenvolvimento vegetativo da *Lactuca sativa* (alface).

A piperovatina, nas concentrações de 0,1 e 0,8 mg mL⁻¹, inibiu o crescimento dos hipocótilos (10,63 a 21,72%) e na concentração de 0,2 mg mL⁻¹, apresentou uma tendência de estímulo sobre o crescimento dos hipocótilos (2,77%). Este efeito veio corroborar com as afirmações feitas por TUKEY JÚNIOR (1969) de que nem todas as substâncias liberadas pelas plantas são inibidoras, ao contrário, elas podem ser estimulantes, e em muitos casos, uma substância pode estimular o crescimento vegetal em baixas concentrações e, em concentrações mais altas, produzir um efeito inibitório. Sobre o crescimento das radículas, a piperovatina apresentou um baixo efeito inibitório (11,86 a 19,62%).

A isopiperlonguminina (0,8; 0,4 e 0,2 mg mL⁻¹) apresentou efeito inibitório sobre o crescimento das radículas (21,70 a 37,31%) e sobre o crescimento dos hipocótilos, nas concentrações de 0,1 e 0,8 mg mL⁻¹, um baixo potencial de inibição foi evidenciado (17,57 a 21,70%).

A mistura de piperovatina com isopiperlonguminina (1:3 – m/m), potencializou o efeito inibitório sobre o crescimento das radículas e hipocótilos de alface, quando comparado ao exibido pelas mesmas quando testadas isoladamente. Estes resultados sugerem um efeito sinérgico entre as substâncias piperovatina e isopiperlonguminina, porém não excluem a possibilidade da espécie *O. martiana* apresentar outros aleloquímicos com efeitos mais significativos.

Também foram testadas fases do extrato desta espécie vegetal, cujos resultados mostraram que as soluções-teste (FRHex e FRClor, FRAcOEt e FRMeOH) não apresentaram, nas concentrações testadas, influência sobre a

germinabilidade da *L. sativa*, porém promoveram um atraso na germinação das mesmas. Estes resultados encontram-se disponíveis na Tabela 24, a seguir.

TABELA 24 – Germinação (G), Índice de Velocidade de Germinação (IVG), Crescimento (C) e Inibição de Crescimento (IC) das Radículas e Hipocótilos de Plântulas de Alface observados nos bioensaios submetidos a diferentes concentrações do extrato, fases e substâncias isoladas da *Ottonia martiana* Miq., Piperaceae.

Amostras	(mg/mL)	G (%)	IG (%)	IVG	Radículas			Hipocótilos		
					C (mm)	C (%)	IC (%)	C (mm)	C (%)	IC (%)
Fase Hexano (FRHex)	0,8	97,5	2,5	26,20	4,76a	31,90	68,10	12,58a	56,26	43,74
	0,4	95,0	5,0	23,33	5,00a	33,51	66,49	14,92b	66,72	33,28
	0,2	95,0	5,0	24,08	5,30a	35,52	64,48	15,38b	68,78	31,22
	0,1	97,5	2,5	24,41	5,15a	34,51	65,49	15,05b	67,31	32,69
	T	100,0		28,59	14,92b			22,37c		
Fase Clorofórmio (FRClor)	0,8	95,0	5,0	20,64	7,89a	54,34	45,66	12,74a	84,37	15,63
	0,4	*92,5	*7,5	19,83	9,25b	63,71	36,29	12,25a	81,13	18,87
	0,2	100,0	0,0	19,15	12,89c	88,77	11,23	14,07b	93,18	6,82
	0,1	100,0	0,0	19,95	10,50d	72,31	27,69	9,73c	64,44	35,56
	T	100,0		24,16	14,53e			15,11d		
Fase Acetato de etila (FRAcOEt)	0,8	97,5	2,5	22,33	11,62a	80,02	19,98	13,85a	91,72	8,28
	0,4	100,0	0,0	27,16	17,20b	118,45	-18,45	19,17b	126,95	26,95
	0,2	100,0	0,0	22,95	11,55a	79,54	20,46	12,00c	79,47	20,53
	0,1	100,0	0,0	25,70	12,72a	87,60	12,40	11,57d	76,62	23,38
	T	100,0		24,16	14,53c			15,11e		
Fase Metanólica (FRMeOH)	0,8	97,5	2,5	19,73	10,69a	73,62	26,38	12,05a	79,80	20,20
	0,4	100,0	0,0	24,25	8,32b	57,30	42,70	6,92b	45,83	54,17
	0,2	100,0	0,0	24,70	14,77c	101,72	-1,72	16,10c	106,62	-6,62
	0,1	100,0	0,0	22,50	13,82d	95,18	4,82	12,27a	94,50	5,50
	T	100,0		24,16	14,53c			15,11d		

T (testemunha). Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância – Resultados comparados aos do controle.

*2 sementes fungaram e não germinaram.

No bioensaio para o potencial alelopático sobre o desenvolvimento das plântulas de *L. sativa* verificou-se que a fase FRHex apresentou, nas concentrações ensaiadas, os maiores efeitos inibitórios sobre o crescimento das radículas (64-68%) e dos hipocótilos (31-43%). A FRClor também produziu, nas

concentrações ensaiadas, efeitos inibitórios sobre o crescimento das radículas (11-45%) e dos hipocótilos (6-35%), porém inferiores aos produzidos pela FRHex. A FRAcOEt exibiu sobre o crescimento das radículas uma tendência de estímulo de crescimento ($0,4 \text{ mg mL}^{-1}$) e um baixo potencial alelopático ($0,1$; $0,2$ e $0,8 \text{ mg mL}^{-1}$). Sobre o crescimento dos hipocótilos, a FRAcOEt exibiu um baixo potencial alelopático nas outras concentrações testadas. A FRMeOH exibiu sobre o crescimento das radículas e hipocótilos, uma tendência de estímulo ($0,2 \text{ mg mL}^{-1}$) e um potencial alelopático na concentração de $0,4 \text{ mg mL}^{-1}$ (42 e 54%, respectivamente).

Os resultados apresentados na Tabela 24 mostraram que o potencial alelopático das fases do extrato da espécie *O. martiana* foram superiores aos exibidos anteriormente pelo próprio extrato e amidas testadas, sugerindo a existência de outros aleloquímicos com efeitos mais significativos, porém não excluem a possibilidade de ocorrência de sinergismo entre constituintes desta espécie vegetal. Cabe salientar que esta é a primeira vez que se realizou uma avaliação do potencial alelopático desta espécie vegetal.

4.7 AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA

4.7.1 Teste Geral de Atividade, Teste Hipocrático (Rastreamento das Doses) Toxicidade Aguda e Dose Letal Mediana (DL_{50})

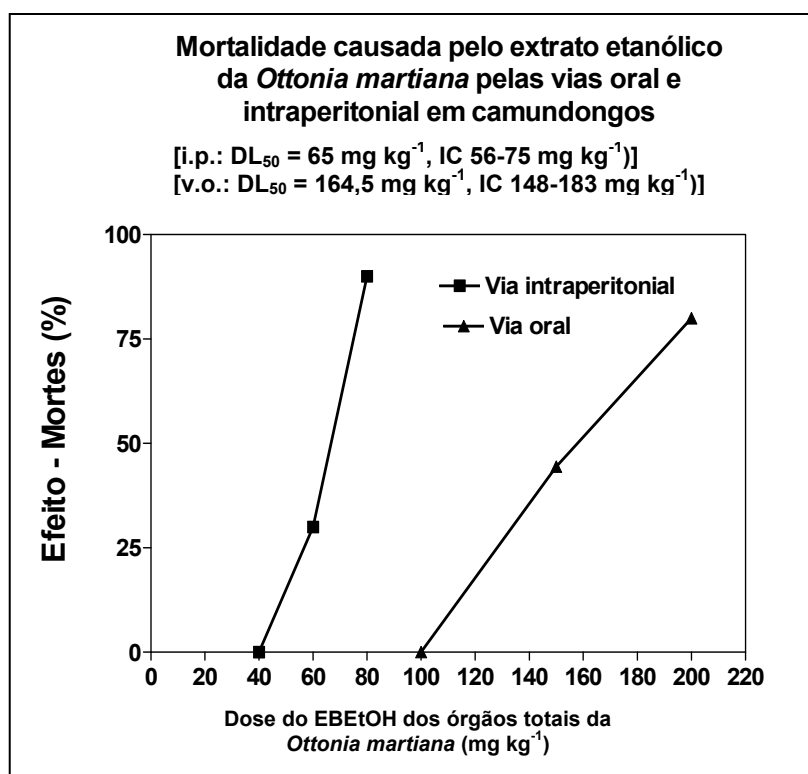
No teste geral de atividade, os camundongos apresentaram sintomas de dor após injeção intraperitoneal, tais como contorções abdominais e vocalização, comportamentos estereotipados tais como cheirar, lambear patas e coçar o focinho

repetidamente. Foram observadas intensa secreção salivar (espuma na boca) e ereção da cauda (prova de Straub positiva). Estes efeitos foram seguidos de tremores, dificuldade respiratória, diminuição da deambulação, do tônus das costas e da capacidade de preensão das patas. A morte ocorreu após episódios de convulsões intercaladas por períodos de intensa sedação.

Todos os efeitos supracitados, exceto as contorções abdominais, foram observados após administração oral do extrato, indicando boa absorção. As mortes começaram a ocorrer a partir da dose de 60 mg kg⁻¹ por via intraperitoneal e de 150 mg kg⁻¹ por via oral.

A DL₅₀ por via oral foi 164,5 mg kg⁻¹, com intervalo de confiança (IC) de 148 a 183 mg kg⁻¹ e por via intraperitoneal, 65 mg kg⁻¹ com intervalo de confiança de 56 a 75 mg kg⁻¹ (Figura 58).

FIGURA 58 – DL₅₀



Como a concentração máxima de amostra recomendada para determinação da DL_{50} é de 2.000 mg kg^{-1} , e que valores inferiores de DL_{50} podem ser utilizados para classificar os agentes tóxicos em vários grupos (QUADRO II), foi possível classificar o EBEtOH em agente altamente tóxico, uma vez que a concentração do mesmo é o somatório das concentrações de cada constituinte presente neste extrato, dentre as quais encontram-se as substâncias bioativas (SOUZA et al., 2003).

QUADRO II – CLASSIFICAÇÃO DOS AGENTES TÓXICOS EM FUNÇÃO DA DL_{50} (LARINI, 1997).

Classificação	(mg kg^{-1})
Supertóxico	0,1
Extremamente tóxico	1,0
Altamente tóxico	10,0
Moderadamente tóxico	100,0
Pouco tóxico	1000,0
Praticamente atóxico	10000,0

4.7.2 Ensaio da Irritação da Mucosa Oral

A ausência de edema, ressecamento e escaras da mucosa oral e da junção labial mostraram a inexistência de irritação na mucosa oral dos animais tratados com o EBEtOH dos órgãos totais de *O. martiana*.

O valor da média final dos dados obtidos neste ensaio (0,1) permitiu classificar o EBEtOH em produto irritante muito leve.

4.7.3. Anestesia Tópica em Córnea de Coelho

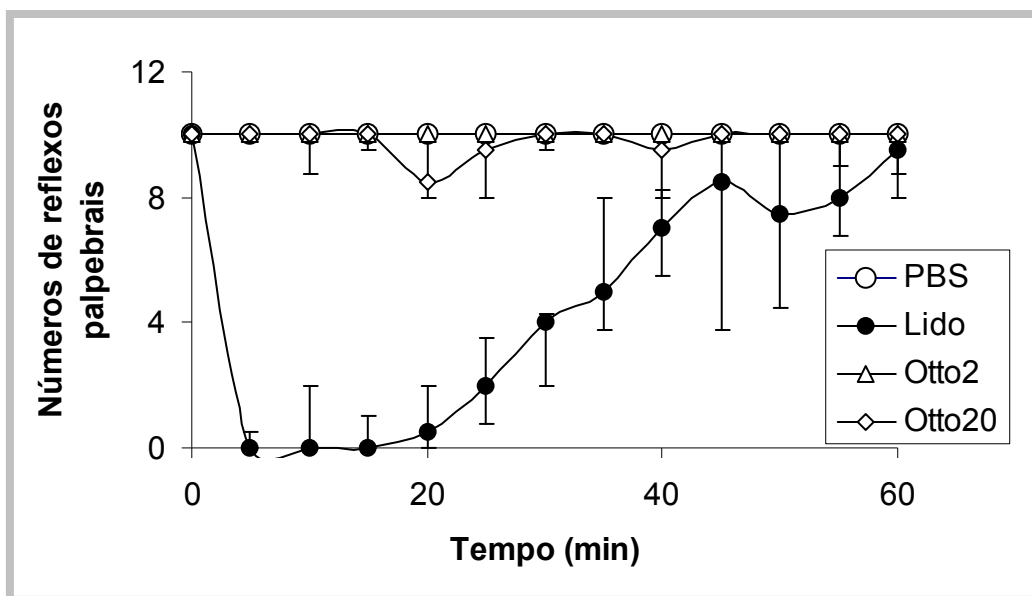
Na ausência das drogas (EBEtOH, lidocaína, salina), os coelhos apresentaram 10 reflexos palpebrais (piscadelas, fechamento do olho – blinking) a cada 10 toques na córnea com fio de nylon.

A aplicação de salina a 15% em etanol, não alterou o número de reflexos palpebrais, enquanto que a lidocaína (20 mg) foi capaz de bloquear completamente os reflexos por aproximadamente 15 minutos, efeito este que foi diminuindo, praticamente desaparecendo ao final de 60 minutos.

O EBEtOH de *O. martiana* (2 mg) não alterou o número de reflexos palpebrais em nenhum dos intervalos medidos e causou intensa salivação e irritação ocular, motivo pelo qual não se testou inicialmente quantidades maiores de EBEtOH. No entanto, tendo-se por base a quantidade de uma substância pura aplicada, a lidocaína (20 mg), percebeu-se a necessidade de aumentar a quantidade do EBEtOH de 2 mg para 20 mg.

Os resultados obtidos no bioensaio de anestesia tópica em córnea de coelhos mostraram que o EBEtOH dos órgãos totais de *O. martiana* não alterou significativamente o número de reflexos palpebrais (10 ± 1 reflexos) nos intervalos de tempo testados, e nas concentrações de extrato aplicadas (2 e 20 mg), indicando ausência de atividade anestésica local (Figura 59).

FIGURA 59 - ANESTESIA TÓPICA EM CÓRNEA DE COELHOS



PBS –Placebo de salina em etanol (15%)

Lido – Lidocaína (20 mg)

Otto2 – EBEtOH dos órgãos totais (2 mg mL⁻¹)

Otto20 - EBEtOH dos órgãos totais (20 mg mL⁻¹)

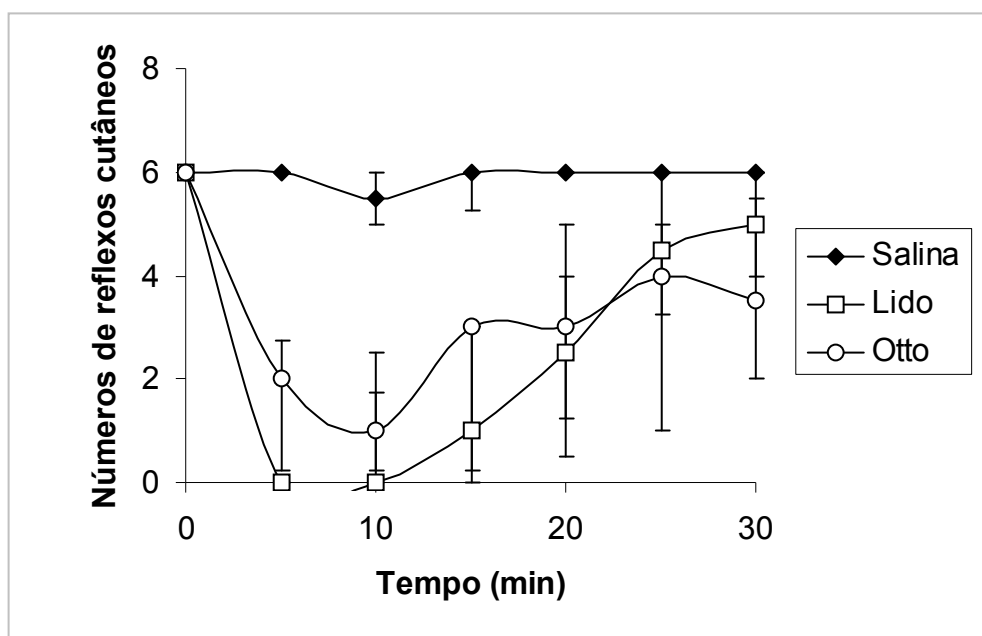
4.7.4 Anestesia Intradérmica

O ensaio dos reflexos cutâneos foi realizado apenas para confirmar a ausência do efeito anestésico local revelado no ensaio dos reflexos palpebrais em coelhos. Contudo, os reflexos cutâneos em cobaias foram inibidos pelo EBEtOH de *O. martiana*.

Não foi observada diferença de sensibilidade nas três diferentes regiões marcadas no dorso das cobaias antes dos tratamentos ou após o tratamento com salina. O resultado em todas essas regiões e ocasiões sempre foi de 5 a 6 reflexos em resposta aos 6 estímulos.

O EBEtOH dos órgãos totais de *Ottonia martiana* (20 mg) inibiu de forma estatisticamente significativa ($p < 0,05$) os reflexos cutâneos causados pela estimulação com agulha no intervalo compreendido entre o quinto e o vigésimo minuto em relação ao grupo salina. O mesmo ocorreu com o grupo tratado com lidocaína (Figura 60).

FIGURA 60 – REFLEXO CUTÂNEO EM COBAIAS TRATADAS COM EXTRATO BRUTO ETANÓLICO DA *Ottonia martiana*.



Salina – Placebo de Salina

Lido – Lidocaína (20 mg)

Otto – EBEtOH dos órgãos totais (20 mg mL⁻¹)

No presente estudo, foi observado que 20 mg do EBEtOH diluído em salina, causou uma diminuição das respostas às picadas da agulha em pele de cobaias. Este efeito acompanhou o efeito produzido pela lidocaína (anestésico padrão). Apenas nos primeiros 5 minutos a lidocaína foi mais efetiva em diminuir as respostas em relação ao EBEtOH. Em contrapartida, em ambos os casos

(anestésico padrão e EB_{Et}OH), o efeito anestésico foi diminuindo progressivamente ao longo dos 30 minutos.

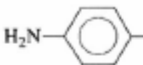
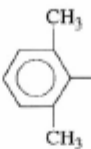
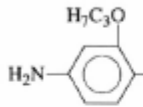
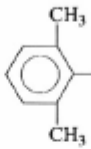
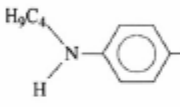
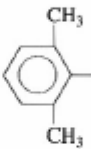
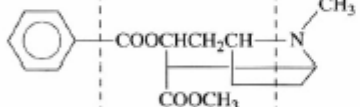
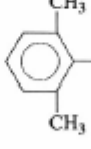
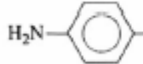
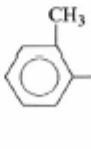
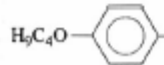
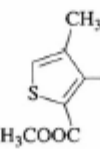
A inibição dos reflexos cutâneos em cobaias pelo EB_{Et}OH sugere uma atividade anestésica local, porém o mesmo só foi ativo no modelo que envolve a indução de dor (picada com agulha).

Como uma das diferenças entre os dois modelos utilizados (anestésico local) envolve a indução de dor, a possibilidade do EB_{Et}OH de *O. martiana* ser, na verdade, um analgésico em vez de anestésico local foi considerada.

Contudo, cabe ressaltar que a maioria das moléculas dos anestésicos locais consiste de uma parte aromática unida por uma ligação éster ou amida a uma cadeia lateral básica (FIGURA 61), sendo bases fracas, com pK_a na faixa 8-9 e parcialmente ionizados em pH fisiológico, fato relacionado à sua capacidade de penetrar na bainha do nervo e na membrana do axônio. Em contrapartida, derivados quaternários que são amplamente ionizados independentemente do pH, são ineficazes como anestésicos locais. Além disso, é importante ressaltar a existência de anestésicos atípicos, sem grupamento básico, dentre os quais pode-se destacar a benzocaína (RANG et al., 2004).

A importância da presença de uma ligação éster ou amida nas moléculas dos anestésicos locais se dá por causa de sua susceptibilidade à hidrólise metabólica. Por isso, cabe salientar que os compostos contendo o grupo funcional éster são geralmente inativados no plasma e nos tecidos (principalmente no fígado) por esterases inespecíficas. Em contrapartida, as amidas são mais estáveis e estes anestésicos geralmente têm meias-vidas plasmáticas mais longas (RANG et al., 2004).

FIGURA 61 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DE ALGUNS ANESTÉSICOS LOCAIS

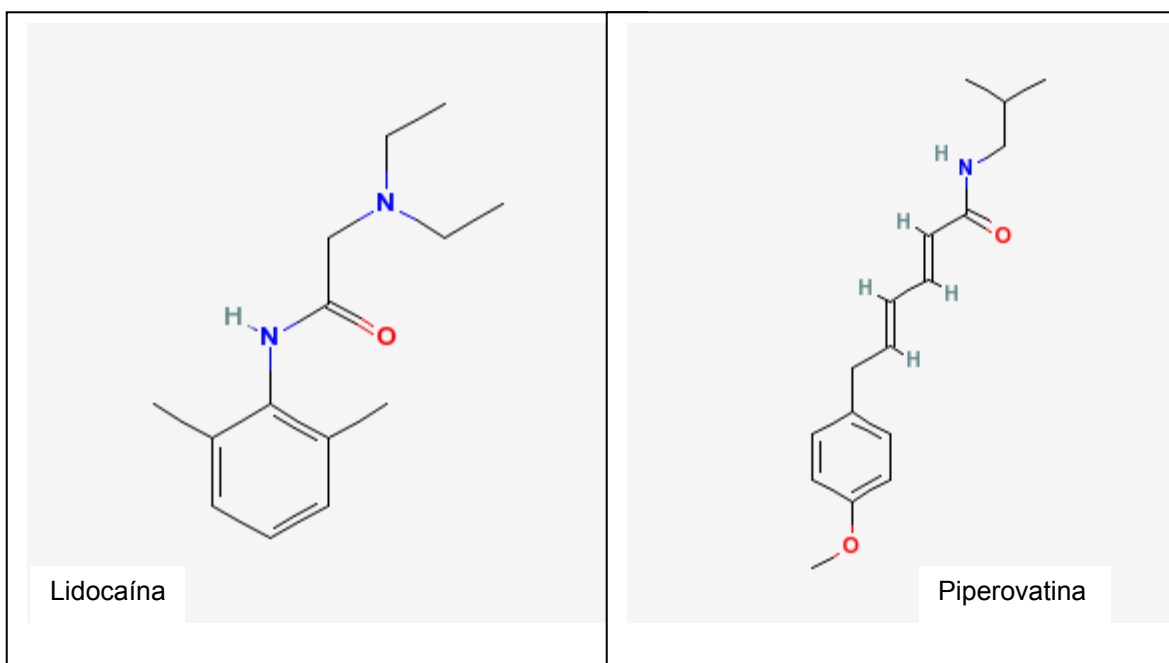
<i>Radical aromático</i>	<i>Cadeia intermediária</i>	<i>Extremidade aminoterminal</i>	<i>Radical aromático</i>	<i>Cadeia intermediária</i>	<i>Extremidade aminoterminal</i>
ÉSTERES			AMIDAS		
	$\text{COOCH}_2\text{CH}_2$	$\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$		NHCOCH_2	$\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$
Procaina			Lidocaína		
	$\text{COOCH}_2\text{CH}_2$	$\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$		$\text{NHCOCH}(\text{C}_2\text{H}_5)$	$\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$
Propoxicaína			Etidocaína		
	$\text{COOCH}_2\text{CH}_2$	$\text{N}(\text{CH}_3)_2$		NHCOCH	$\text{N}(\text{CH}_3)_2$
Tetracaína			Mepivacaína		
	$\text{COOCH}_2\text{CH}_2$	$\text{N}(\text{CH}_3)_2$		NHCOCH	$\text{N}(\text{C}_4\text{H}_9)_2$
Cocaína			Bupivacaína		
	$\text{COOCH}_2\text{CH}_3$			$\text{NHCOCH}(\text{CH}_3)$	$\text{N}(\text{CH}_3)_2$
Benzocaína			Prilocaína		
	COCH_2CH_2	$\text{N}(\text{CH}_3)_2$		$\text{NHCOCH}(\text{CH}_3)$	$\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$
Diclonina*			Articaína		

FONTE: RANG et al.(2004)

Apesar da amida piperovatina assemelhar-se estruturalmente aos anestésicos locais como a lidocaína (FIGURA 62), esta pode não apresentar efeito anestésico, uma vez que tem ação de abridor de canais de Na^+ voltagem dependente e não de bloqueador (MCFERREN et al., 2002).

O aumento da concentração de Ca^{++} intracelular é também um grande indicativo de liberação de neurotransmissores, fato que parece explicar a ação sialagoga da piperovatina, a qual em neurônios colinérgicos pode liberar acetilcolina, estimulando a salivação.

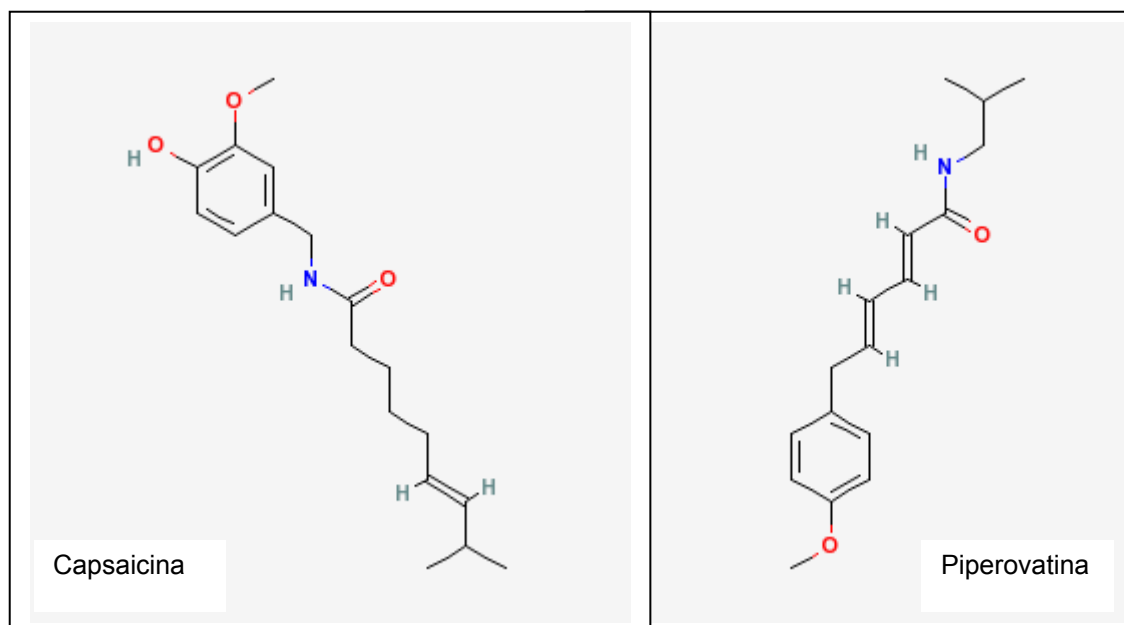
FIGURA 62 – ESTRUTURA QUÍMICA DAS SUBSTÂNCIAS LIDOCAÍNA E PIPEROVATINA



FONTE: <http://www.chemindustry.com/chemicals> (2006)

É importante ressaltar que a piperovatina por ser quimicamente análoga à capsaicina (FIGURA 63), pode apresentar os mesmos efeitos desta, atuando como um analgésico, cujo mecanismo de ação induz estimulação dos neurônios aferentes nociceptivos por se ligar a um receptor expresso neles (receptor vanilóide). Esse receptor é um canal de cátions, acionado por ligantes, permeável ao Na^+ e ao Ca^{++} . Além disso, a capsaicina é um agonista desse receptor e propicia aumento no influxo de Ca^{++} (RANG et al., 2004) causando a liberação de vários neuropeptídeos envolvidos na transmissão dolorosa, incluindo principalmente as taquicinas (substância P, neurocinina A e neurocinina B) (SAKURADA et al., 1992), sendo a ação inicial da capsaicina estimulante, a qual pode ser seguida por uma dessensibilização da terminação nervosa, podendo fazer depleção de substância P, e como consequência, anular a sensação de dor (www.saj.med.br, 2007).

FIGURA 63 – ESTRUTURA QUÍMICA DAS SUBSTÂNCIAS CAPSAICINA E PIPEROVATINA



FONTE: www.chemindustry.com/chemicals (2006)

Segundo Miriam Seligma Menezes (www.saj.med.br, 2007), os receptores vanilóides estão localizados em fibras de pequeno e médio diâmetros, que correspondem as fibras C e A-delta tipo II e são sensíveis a temperaturas elevadas ($\approx 43^{\circ}$). O mecanismo de ação da ativação dos receptores pelo calor e pela capsaicina se faz através da abertura de canais de cálcio não seletivos, que são altamente permeáveis ao cálcio. Íons hidrogênio e lipídios são ativadores endógenos desses receptores, induzindo a uma excitação mantida e prolongada. Para a autora supracitada, estes receptores estão distribuídos amplamente no organismo, desde queratinócitos, na pele, até musculatura lisa da bexiga, no fígado, em células hematopoiéticas e células epiteliais da via aérea. Além disso, inúmeros estudos evidenciam que a atividade dos receptores vanilóides é regulada por múltiplos níveis de fosforilação reversível, compartimentalização subcelular e expressão de genes. Também, acredita-se que a sensibilização e ou a ativação direta por cinases e a dessensibilização por fosfatases envolvem os receptores vanilóides no mecanismo de ação da bradicinina, nicotina e etanol.

Todavia, cabe destacar que anestésicos locais como a lidocaína parecem bloquear esses receptores por um mecanismo ainda não muito claro, visto "up-regulation" de receptores vanilóides ser demonstrado em doença inflamatória do intestino e síndrome do cólon irritável, assim como expressão anormal de receptores vanilóides em locais, aonde originalmente não existem esses receptores, ocorrendo em situações de hiperalgesia e de dor neuropática (www.saj.med.br, 2007).

Pelo exposto, o mecanismo de ação descrito acima é inespecífico, já que a abertura dos canais de Na^+ pode levar a abertura de canais de Ca^{++} voltagem dependente por todo o organismo. Esse último pode ter como conseqüências a liberação de neurotransmissores e neuromoduladores, além da liberação de neuropeptídeos, ocorrência de espasmos musculares e até parada respiratória, mostrando que o extrato bruto desta planta é muito tóxico e sua utilização restrita ao uso tópico, já que é muito bem absorvido.

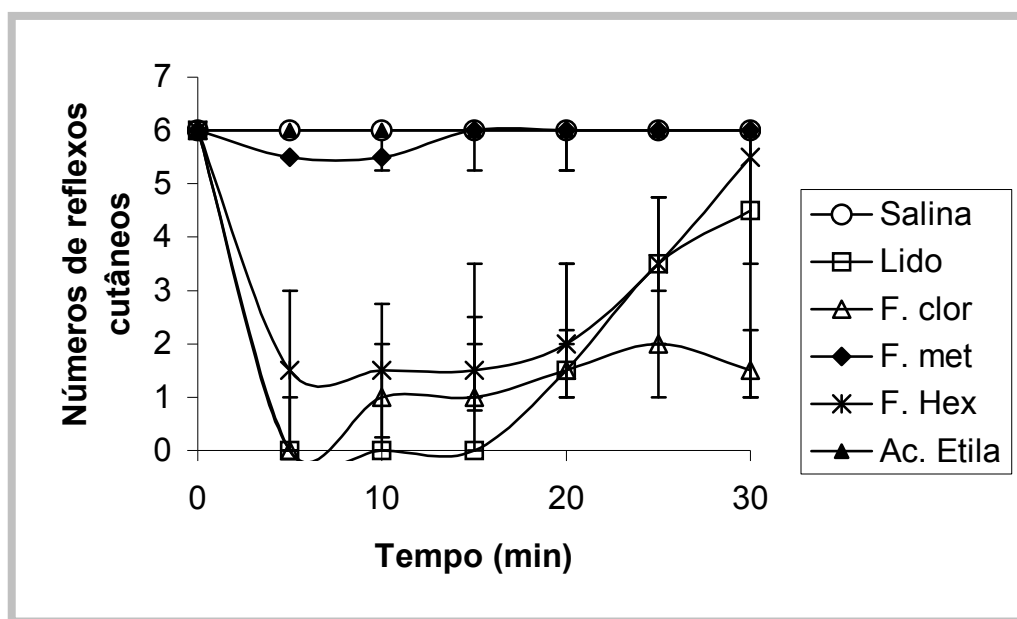
Como os vanilóides são um dos nociceptores recentemente descobertos, a sua estrutura ainda não foi completamente elucidada. Alguns vanilóides, como a piperina (o composto picante da pimenta do reino), promovem a fase 1 da ação do receptor vanilóide (produzindo dor) mas não dessensibilizam. Outros, como o olvanil, são analgésicos potentes mas não produzem a fase inicial (dor) do receptor. Diante disso, vanilóides podem ativar ou inibir nociceptores (www.drashirleydecampos.com.br, 2007). Também cabe ressaltar que os receptores vanilóides e canabinóides estão profundamente relacionados, pois algumas moléculas podem interagir com ambos (anandamida), fato que tem despertando interesse dos químicos para a síntese de novas drogas. Desta forma, além de combater a dor, estas drogas poderiam desempenhar outras funções, pela estimulação dos receptores canabinóides (www.qmc.ufsc.br/qmcweb/artigos, 2007).

Sendo assim, os efeitos do EBEtOH da *O. martiana* observados no presente estudo, somados à sua alta toxicidade, mostram que são necessários mais estudos com componentes isolados desta espécie vegetal, assim como

identificação de outros prováveis ativos. Por esta razão, as fases deste EBEtOH também foram avaliadas, com a finalidade de se encontrar a(s) fase(s) bioativa(s).

Os resultados obtidos nesta avaliação encontram-se inseridos na Figura 64, a seguir.

FIGURA 64 – REFLEXO CUTÂNEO EM COBAIAS TRATADAS COM FASES DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO DA *Ottonia martiana*.



Lido – lidocaína / F. Clor – fase clorofórmio (FRClor)

F. Met. – fase metanólica (FRMeOH) / F. Hex – fase hexano (FRHex)

F. Ac. Etila – fase acetato de etila (FRAcOEt)

As fases metanólica (5 mg) e acetato de etila (1,5 mg) não inibiram os reflexos cutâneos, em contrapartida, as fases clorofórmica (10 mg) e hexânica (6 mg) inibiram os reflexos cutâneos de forma estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Estes resultados permitiram detectar as fases bioativas do EBEtOH: a FRHex e FRClor.

Considerando-se a elevada toxicidade do EBEtOH dos órgãos totais de *O. martiana* e das suas fases bioativas, as quais não permitem a administração sistêmica, uma atividade do tipo "analgésica local" é sugerida. Uma explicação para esta atividade pode estar relacionada à abertura de canais de sódio de amidas tais como a piperovatina, presente no extrato, a qual pode levar à liberação neuronal de diversos compostos endógenos, que podem impedir a discriminação dos estímulos algésicos.

Contudo, o efeito anestésico local não foi descartado, uma vez que o seu mecanismo de ação pode ser diferente dos anestésicos locais já conhecidos. Por isso, novos modelos (receptores vanilóides e purinérgicos, entre outros) devem ser testados, a fim de elucidar o efeito exibido pelo EBEtOH dos órgãos totais da *O. martiana*. Ademais, como nesta espécie vegetal foi detectado β -cariofileno, um sesquiterpeno com reconhecida propriedade anestésica local (GHELARDINI et al., 2001), a possibilidade de sinergismo entre constituintes do EBEtOH da *O. martiana* não deve ser descartada.

5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no desenvolvimento deste trabalho permitiram concluir que:

- ✓ Pelo estudo fitoquímico dos EBEtOH das raízes, frutos, caules e folhas de *O. martiana* foi possível identificar 94 metabólitos secundários, dentre os quais 13 foram isolados e purificados, sendo inéditos para a espécie *O. martiana*: (3*E*,5*E*)-*N*-isobutil-6-(4-metóxfenil) hexa-3,5-dienamida, os esteróides β -sitosterol e estigmasterol, os ácidos *p*-anísico e piperonílico, o metil-éster-14-metil-heptadecanóico e o sal Na₂SO₄. Os óleos essenciais das folhas, frutos e raízes de *O. martiana* apresentaram os mesmos constituintes, porém em quantidades diferentes. O espatulenol apresentou-se como componente majoritário dos óleos das raízes e dos frutos e o β -cariofileno como principal componente do óleo essencial das folhas.
- ✓ O EBEtOH dos órgãos totais de *O. martiana* apresentou potencial antibacteriano sobre o crescimento de bactérias Gram positivas testadas e frente a *Serratia marcescens* (Gram negativa), sugerindo que há substâncias bioativas no extrato com pouca difusibilidade nos meios de cultura empregados nos bioensaios. Dentre os diversos componentes bioativos exibidos nos bioautogramas foi possível identificar as amidas piperovatina, piperlonguminina e isopiperlonguminina, as fases Fhex e Fclor, além de alguns componentes ativos dos óleos essenciais: α -pineno, β -pineno, mirceno, α -copaeno, β -cariofileno e δ -cadineno.
- ✓ Os resultados dos testes antifúngicos sugerem que o EBEtOH dos órgãos totais apresenta potencial antifúngico mais acentuado sobre o desenvolvimento vegetativo dos fitopatógenos ensaiados, visto este inibir a germinação dos esporos do *C. spathulatum* e apresentar uma tendência de estímulo à germinação de esporos do *B. cinerea*. Pela bioautografia direta foram detectadas zonas de inibição de crescimento

micelial dos fungos ensaiados permitindo identificar uma das substâncias bioativas: a piperovatina.

- ✓ Os EBEtOH desta planta, suas fases, piperovatina e isopiperlonguminina apresentam potencial alelopático, o qual foi intensificado pela mistura destas amidas. Porém, a possibilidade da ação de outros aleloquímicos com efeitos mais significativos (ácido *p*-anísico), não foi descartada.
- ✓ O EBEtOH dos órgãos totais de *O. martiana* apresentou-se como irritante leve sobre a mucosa oral dos ratos testados, apesar da DL₅₀ (164,5 mg/kg por via oral e de 65 mg/kg por via intraperitoneal) mostrar elevada toxicidade, justificando a utilização deste por aplicação local ou tópica.
- ✓ A inibição dos reflexos cutâneos em cobaias e não inibição dos reflexos palpebrais em coelhos sugere uma atividade analgésica do EBEtOH, uma vez que o mesmo só é ativo no modelo que envolve a indução de dor (picada com agulha), podendo estar relacionado à abertura de canais de sódio pela piperovatina presente no extrato, liberando compostos endógenos que podem impedir a discriminação dos estímulos algésicos. Apesar disso, o efeito anestésico local não foi descartado pois este extrato pode atuar via receptores vanilóides e canabinóides. O teste farmacológico intradérmico permitiu detectar as fases bioativas do EBEtOH da *O. martiana*: FHex e FClor.
- ✓ As amidas piperovatina, piperlonguminina e isopiperlonguminina parecem ser os constituintes de maior atividade antimicrobiana (antibacteriana e antifúngica), porém não foi descartada a existência de outros bioativos orgânicos e inorgânicos mais significativos com a ocorrência ou não de sinergismo.

5.1. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar de não ter sido esclarecido o mecanismo de ação do EBEtOH desta espécie vegetal, os efeitos evidenciados neste estudo mostraram-se compatíveis com o emprego desta planta na terapêutica popular (tratamento de odontalgias e reumatismo), por via tópica.

O potencial químico apresentado pela *O. martiana* neste estudo multidisciplinar mostrou esta espécie vegetal como possível fonte de novos fitofármacos e fitoterápicos pelo fornecimento de analgésicos, anestésicos e antimicrobianos para a terapêutica e dentística humana, além de agroquímicos pelo fornecimento de novos fungicidas naturais.

Como resultados obtidos em estudos de atividades biológicas devem ser explicados em termos de uma abordagem multidisciplinar, e reconhecendo que muitos aleloquímicos são utilizados na medicina popular para a cura de doenças, cujos efeitos genotóxicos e mutagênicos necessitam de maiores investigações, estudos complementares devem ser realizados com esta espécie vegetal, considerando-se a necessidade atual de uso racional e domesticação de plantas com bioatividades cientificamente comprovadas e que contemplem o desenvolvimento sustentável de uma região, sem degradação das fontes naturais ou riscos ao meio ambiente.

REFERÊNCIAS

ADAMS, R. P. **Identification of Essential oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry**. Carol Stream: Allured Publ. Corp., 1995. 469 p.

ANTUNES, P. A.; CHIERICE, G. O; CONSTANTINO, C. J. L.; AROCA, R. F. Spectroscopic characterization of *N*-isobutyl-6-(*p*-methoxyphenyl) 2*E*-4*E*-hexadieneamide extracted from *Ottonia propinqua*. **Vibrational Spectroscopy**. v.27, p.175-181, 2001.

AUER, C. G.; BETTIOL, W. Efeito da serapilheira de *Eucalyptus grandis* no crescimento micelial de *Pisolithus tinctorius* em meio de cultura. **IPEF**. Piracicaba, n. 32, p. 49-51, abril, 1986.

BARBOSA-FILHO, J. M.; LIMA, C. A. S.; AMORIM, E. L. C.; SENA, K. X. F. R.; ALMEIDA, J. R. G. S.; CUNHA, E. V. L.; SILVA, M. S.; AGRA, M. F.; BRAZ-FILHO, R. Botanical study, phytochemistry and antimicrobial activity of *Tabebuia aurea*. **International Journal of Experimental Botany**. v. 53, p.221-228, 2004.

BARTSCH, H.; MONTESANO, R. Relevance of nitrosaminas to human cancer. **Carcinogenesis**, v.5, p.1381-1393, 1984.

BOWDEN, G. H. Mutans streptococci caries and chlorhexidine. **Journal of the Canadian Dental Association**, v.62, n.9, p.700, Sep., 1996.

BRANDON, K.; FONSECA, G. A. B.; RYLANDS, A. B.; SILVA, J. M. C. Conservação Brasileira: desafios e oportunidades. **Megadiversidade**, v.1, p.7-13, 2005.

BRITO, A. R. M. S. **Manual de ensaios toxicológicos *in vivo***. Campinas: UNICAMP, 1994. p. 31.

BUCKINGHAM, J. **Dictionary of natural products on CD-ROM**, 4th ed., Chapman; London: Hall, 1998.

BÜLBRING, E.; WAJDA, I. Biological comparison of local anesthetics. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.85, p.78-84, 1945.

CAMA RAMACCIATO, J. **Atividade antimicrobiana de soluções à base de alho (*Allium sativum*), óleo de melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) e clorexidina sobre microrganismos totais e estreptococos do grupo mutans. Estudo *in vivo***. 2000. 88 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba.

CAMPOS, S. Teen medicina /Jovem: atração sexual é hormonal? **Biology of Reproduction**, v.68, n.6, p.2107-2113, 2003.

CARDOSO FILHO, J. A. **Efeito de extratos de albedo de laranja (*Citrus cinensis*) dos indutores de resistência ácido salicílico, acilbenzolar-s-metil e *Saccharomyces cerevisiae* no controle de *Phyllosticta citricarpa* (teleomorfo: *Guignardia citricarpa*)**. 2003. 126f. Tese (Doutorado em Agronomia). Universidade de São Paulo, Piracicaba.

CARRERO, C.; CEDENO, L.; QUINTERO, K.; PINO, H.; RODRÍGUEZ, L. Identificación y sensibilidad *in vitro* a fungicidas del agente causal de la podredumbre del tallo en plántulas de *Eucalyptus cinerea* en Mérida, Venezuela . **Interciencia**, vol.28, n.11, p.656-659, 2003.

CARVALHO, J. L. S. **Contribuição ao estudo Fitoquímico e Analítico do**

***Nasturtium officinale* R.Br., Brassicaceae.** 2001. 88f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

CECHINEL FILHO, V; YUNES, R. A. Estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**. v.21, n.1, p.99-105, 1998.

CHATTOPADHYAY, D.; ARUNACHALAM, G.; MANDAL, A. B.; SUR, T. K.; MANDAL, S. C.; BHATTACHARYA, S. K. Antimicrobial and anti-inflammatory activity of folklore: *Mallotus peltatus* leaf extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v.82, n.2-3, p.229-237, 2002.

CORDEIRO, C. H. G.; SACRAMENTO, L. V. S.; CORREA, M. A; PIZZOLITTO, A. C.; BAUAB, T. M. Herbal extracts in an experimental mouthwash: pharmacognostics analysis and antibacterial activity. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v.42, n.3, p.395-404, 2006.

COSTA, S. S.; MORS, W. B. Amide of *Ottonia corcovadensis*. **Phytochemistry**, v.20, n.6, p. 1305-1307, 1981.

COUTINHO, H. L. C. Diversidade microbiana e agricultura sustentável [online]. CNPS/EMBRAPA, 1996. Disponível em: <http://www.bdt.org.br/~marinez/padct.bio/cap9/1/heitor.html>. Arquivo capturado em 10 de dezembro de 2006.

CRONQUIST, A . **An integrated system of classification of flowering plants.** New York: Columbia University Press, 1981. 1260 p.

CUNICO, M. M. **Estudo fitoquímico e das atividades antimicrobianas da *Ottonia***

***martiana* Miq. – Piperaceae.** 2001. 83f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

CUNICO, M.M.; CÍRIO, G.M.; MIGUEL, O.G.; MIGUEL, M. D.; MONTRUCCHIO, D. P.; AUER, C.G.; GRIGOLETTI-JÚNIOR, A. Contribuição ao estudo da atividade antifúngica de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss., Celastraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.12, n.2, p.69-73, 2002.

CUNICO, M. M.; MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. D.; KERBER, V. A.; MONTRUCCHIO D. P.; AUER, C. G.; GRIGOLETTI JÚNIOR, A. Avaliação da atividade antibacteriana de *Ottonia martiana* Miq., Piperaceae. **Revista de Ciências Farmacêuticas**, v. 24, n.2, p. 141-145, 2003a.

CUNICO, M. M.; MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. D.; CARVALHO, J. L. S.; MONTRUCCHIO D. P.; FERREIRA, J. L.; OLIVEIRA, J. S. Extração de esteróides em frutos de *Ottonia martiana* Miq., Piperaceae, com gás liqüefeito. **Química Nova**. v. 16, n.6, p.803-806, 2003b.

CUNICO, M. M.; CARVALHO, J. L. S.; SILVA, V. C.; MONTRUCCHIO, D. P.; KERBER, V. A.; GRIGOLETTI JR., A.; AUER, C. G.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Avaliação antifúngica de extratos obtidos de *Ottonia martiana* Miq. (Piperaceae) sobre três fitopatógenos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.71, (supl.), p.141-143, 2004.

DUNSTAN, W. R.; GARNETT, H. The constituents of *Piper ovatum*. **Journal of the Chemical Society**, v.67, p. 94-103, 1895.

DYER, L. A.; DODSON C. D.; STIREMAN. J. O.; TOBLER, M. A.; SMILANICH, A. M.; FINCHER, R. M.; LETOURNEAU, D. K. Synergistic effects of three *Piper* amides on generalist and specialist herbivores. **Journal of Chemical Ecology**, v.29, n.11,

p.2499-2514, 2003.

EL-GHOLL, N. E.; KIMBROUGH, J. W.; BARNARD, E. L.; ALFIERI, S. A.; SCHOULTIES, C. L. *Calonectria spathulata* sp.nov. **Mycotaxon**, v.26, p.151-164, 1986.

ENGLER, A. **Syllabus der Pflanzenfamilien**. 12 auf. Berlim Borntraeger, v.2, 1964.

ESTRELA, J. L. V.; GUEDES, R. N. C.; MALTHA, C. R. A.; FAZOLIN, M. Toxicidade de amidas análogas à piperina a larvas de *Ascia monusteorseis* Godart (Lepidoptera: Pieridae) e *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology**, v.32, n.2, p.343-346, 2003.

FACUNDO, V. A.; MORAIS, S. M.; BRAZ FILHO, R. Constituintes químicos de *Ottonia corcovadensis* Miq. da floresta Amazônica — atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio e carbono. **Química Nova**, v. 27, n. 1, 2004.

FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. 520p.

FERREIRA, F. A. **Patologia florestal, principais doenças florestais no Brasil**. Viçosa: Ed. Folha de Viçosa, 1989. 571p.

FIGUEIREDO, R. A.; SAZIMA, M. Pollination biology of Piperaceae species in southeastern Brazil. **Annals of Botany**, v.85, p. 455-460, 2000.

FRANCO, F. **Tabela de Composição de Alimentos**. 9ªed., São Paulo: Atheneu, 1998. 324p.

GADGOLI, C.; MISHRA, S. H. Antihepatotoxic activity of *p*-methoxy benzoic acid from *Capparis spinosa*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.66, n.2, p.187-192,

1999.

GAGNON, H.; IBRAHIM, R. K. Effects of various elicitors on the accumulation and secretion of isoflavonoids in white lupin. **Phytochemistry**, v.44, n.8, p.1463-1467, 1997.

GATTI, A. B. **Atividade alelopática de extratos aquosos de *Aristolochia esperanzae* O. Ktze e *Ocotea odorífera* (Vell) Rohwer na germinação e crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Raphanus sativus* L.** 2003. 148f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

GHELARDINI, C.; GALEOTTI, N.; DI CESARE MANNELLI, L.; MAZZANTI, G.; BARTOLINI, A. Local anaesthetic activity of *beta*-caryophyllene. **Fármaco**, v.56, n.5, p.387-389, 2001.

GIESBRECHT, A. M.; ALVARENGA, M. A.; GOTTLIEB, O. R.; GOTTLIEB, H. R. (2*E*,4*E*)-*N*-isobutyl-9-piperonyl-nona-2,4-dienoic amide from *Ottonia anisum*. **Planta Medica**, v.43, p. 375-377, 1981.

GOTTLIEB, O. R.; MAGALHÃES, M. T. Isolation of piperonylic acid from *Ocotea pretiosa*. **Nature**, v. 182, p.742-743, 1958.

GOULART, M. O. F.; SANTANA, A. E. G.; LIMA, R. A.; CAVALCANTE, S. H. Fitoconstituintes químicos isolados de *Jatropha eliptic*. **Química Nova**, v.16, n.2, p.95-100, 1993.

GRASSI, R. F.; RESENDE, U. M.; SILVA, W.; MACEDO, M. L. R.; BUTERA, A. P.; TULLI, E. O.; SAFFRAN, F. P.; SIQUEIRA, J. M. Estudo fitoquímico e avaliação alelopática de *Memora peregrina* – “ciganinha” – Bignoniaceae, uma espécie invasora de pastagens em Mato Grosso do Sul. **Química Nova**, v.28, n.2, p.199-

203, 2005.

GUIMARÃES, E. F.; ICHASO, C. F. L.; COSTA, C. G. Piperaceae. In: **Flora Ilustrada Catarinense**. Itajaí, Herbário Barbosa Rodrigues, 1978. 27 p.

GULERIA, SANJAY; KUMAR, ASHOK. Antifungal activity of some Himalayan medicinal plants using direct bioautography. **Journal of Cell and Molecular Biology**, v.5, p.95-98, 2006.

HANDA, S. S.; CHAWLA, A. S.; SHARMA, A. K. Plants with anti-inflammatory activity. **Fitoterapia**, v.63, p. 3-31, 1992.

HÄNSEL, R.; LEUSCHKE, A.; BOHLMANN, F. New isobutylamide from *Ottonia ovata*. **Planta Medica**, v.40, p. 161-163 (oct), 1980.

HELENO, V. C. G. **Estudo de transformações químicas em produtos naturais polifuncionalizados**. 1999 (Dissertação de Mestrado, Departamento de Química, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo).

HOMANS, A. L.; FUCHS, A. Direct bioautography on thin-layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances. **Journal of Chromatography**, v.51, p.327-330, 1970.

HOSTETTMANN, K. Strategy for the biological and chemical evaluation of plant extracts. **Pure and Applied Chemistry**, v.70, n.11, p. 23-27, 1998.

<http://strano16.interfree.it/vertebrata.htm>. Acessado em 20/12/2006.

<http://www.cobea.org.br>. Acessado em 20/12/2006.

<http://www.drashirleydecampos.com.br/noticias.php?noticiaid=4690&assunto=Farmacologia,%20bioqu%C3%ADmica,fisiologia>. Acessado em 20/10/2007.

<http://www.chemindustry.com/chemicals>. Acessado em 20/11/2006.

<http://www.nlac.mahidol.ac.th>. Acessado em 20/12/2006.

<http://www.qmc.ufsc.br/qmcweb/artigos/dor/perspectivas.htm>. Acessado em 20/10/2007.

http://www.qmc.ufsc.br/qmcweb/artigos/dor/quimica_vs_dor.htm. Acessado em 20/10/2007.

<http://www.reitoria.ufsc.br/prpg/bioterio/especies.htm>. Acessado em 20/12/2006.

<http://www.saj.med.br/uploaded/File/novosartigos/123%20-%20Importancia%20dos%20receptores%20de%20Dor%20-%20Miriam%20Seligman%20Me.pdf>. Acessado em 20/03/2007.

JOHNSON; JOHNSON BIOSEARCH INCORPORATED. **Summary of Results of a Gingival Irritation Study**. Philadelphia, Pensilvania, setembro, 1982.

KATO, M. J.; GUIMARÃES, E. F.; REIGADA, J. B.; RAMOS, C. S.; CASANOVA, D. C. C.; MALQUICHAGUA, K. S.; MARQUES, J. V.; SILVA, A. M.; BERNARDES, L. S. C.; MORANDIM, A. A.; BERGAMO, D. C. B.; SILVA, R. V.; NAVICKIENE, H. D.; SOARES, M. G.; LAGO, J. H. G.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; YOUNG, M. C. M.; LOPES, N. P.; ALBUQUERQUE, S.; PUPO, M. T.; CARVALHO, I.; BORTOLI, S. A. ; MURATA, A. T.; KAWANO, T.; TEIXEIRA, E.; MIRANDA, J. E.; FURLAN, M. Evolução metabólica em espécies de Piperaceae. XXVI **Reunião Anual sobre Evolução, Sistemática e Ecologia Micromoleculares Instituto de Química, Universidade Federal Fluminense, 1 a 3 de dezembro de 2004**. XXVI RESEM p.27.

KUZE RATES, S. M.; CHAVES, C. G.; VON POSSER, G. L. Investigation of local anesthetic effect and toxicity of *Ottonia propinqua* (Piperaceae). **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v.16, p. 113-116, apr.-jun., 1997.

LAGO, J. G. L.; RAMOS, C. S.; CASANOVA, C. C. D.; MORANDIM, A. A.; BERGAMO, C. D.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M.; GUIMARÃES, E. F.; YOUNG, M. M. C.; KATO, M. J. Benzoic Acid derivates from Piper species and their fungitoxic activity against *Cladosporium cladosporioides* and *C. sphaerospermum*. **Journal of Natural Products**, v.67, n.11, p.1783-1788, 2004.

LARINI, L. **Toxicologia**. São Paulo: Manoele, 3. ed., 1997. 43p.

LIMBERGER, R. P.; SOBRAL, M.; HENRIQUES, A. T.; MENUT, C.; BESSIÈRE, J. M. Óleos voláteis de espécies de *Myrcia* nativas do Rio Grande do Sul. **Química Nova**, v.27, n.6, p.916-919, 2004.

LITCHFIELD, J. T.; WILCOXON, F. Simple method of fitting dose effect curve. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.95, p.99-113, 1949.

LOPES, M. **Contribuição para o Estudo Fitoquímico de *Ottonia martiana* Miq. – Piperaceae**. Curitiba, 1989. 102 f. Dissertação (Mestrado em Botânica), Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR, V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v.25, n.3, p. 429-438, 2002.

MAKAPUGAY, H. C.; SOEJARTO, D. D.; KINGHORN, A. D.; BORDAS, E. Piperovatine, the tongue-numbing principle of *Ottonia frutescens*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.7, p. 235-238, 1983.

MARTINS, E. R. **Plantas Medicinais**. Viçosa: Edição Imprensa Universitária – UFV, Minas Gerais, 1995. 220p.

MAURICE, C. G. Antimicrobial activity of root canal sealing agents. **Journal of Dental Medicine**, v. 20, n. 1, p. 7-12, 1965.

MCFERREN, M. A.; CORDOVA, D.; RODRIGUEZ, E.; RAUH, J. J. *In vitro* neuropharmacological evaluation of piperovatine, an isobutylamide from *Piper piscatorum* (Piperaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 83, n. 3, p. 201-207, 2002.

MCFERREN, M. A.; RODRIGUEZ, E. Piscicidal properties of piperovatine from *Piper piscatorum*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.60, p. 183-187, 1998.

MEDEIROS PERIN, F. **Avaliação *in vitro* do efeito bactericida promovido por diferentes métodos de desinfecção do canal radicular**. 2001. 80 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto.

MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. **Desenvolvimento de Fitoterápicos**. São Paulo: Editorial Robe, 1999. 115 p.

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, v.24, n.1, p.105-111, 2001.

MOREIRA, D. L.; KAPLAN, M.; GUIMARÃES, I. 1-Butil-3,4-metihylenedioxybenzene as the major constituent of essential oil from *Ottonia anisum* Sprengel (Piperaceae). **Journal of Essential Oil Research**, v.9, n.5, p. 565-568, 1997.

MOREIRA, M. A. B.; ZARBIN, P. H. G.; CORACINI, M. D. A. Feromônios

associados aos coleópteros-praga de produtos armazenados. **Química Nova**, v.28, n.3, p.472-477, 2005.

NASCIMENTO, G. G. F. **Roteiro de aulas práticas microbiologia geral**. Apostila de Microbiologia Geral. Universidade Metodista de Piracicaba. 2003. 45p.

NAVARRETE, A.; TREJO, M.; REYES, T. Principles of root bark of *Hippocratea excelsa* (Hippocrataceae) with gastroprotective activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.79, n.3, p.383-388, 2002.

NAVARRO, D. M. A. F.; MURTA, M. M.; DUARTE, A. G.; LIMA, I. S.; NASCIMENTO, R. R.; SANT'ANA, A. E. G. Aspectos práticos relacionados ao uso do rincoforol, o feromônio de agregação da broca-do-olho-do-coqueiro *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera: Curculionidae), no controle de pragas do coqueiro: análise de sua eficiência em campo. **Química Nova**, v.25, n.1, p.32-36, 2002.

NUNES, A. P. M.; ARAÚJO, A. C.; Ausência de genotoxicidade do esteviosídeo em *E. coli*. In. X Semana de Iniciação Científica da UERJ, Rio de Janeiro, 2003. Anais. p.15.

OLIVEIRA ALMEIDA, C. R. Química Orgânica I: anotações de aulas. EEL-Campus USP – Lorena. http://www.dequi.eel.usp.br/~croa/Organica1_Apostila%20Completa_2007-2008.pdf. Acessado em 20/01/2007.

PARMAR, V. S.; JAIN, S. C.; BISHT, K. S.; JAIN, R.; TANEJA, P.; JHA, A.; TYAGI, O. M. D.; PRASAD, A. K.; WENGEL, J.; OLSEN, C. E.; BOLL, P. M. Phytochemistry of the genus Piper. **Phytochemistry**, vol.46, n.4, p.591-673, 1997.

PHILLIPSON, J. D.; ANDERSON, L. A. Ethnopharmacology and Western medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v.25, n.1, p.61-72, 1989.

PINDER, A. R.; PRICE, S. J. The chemistry of *Ottonia vahlii* Kth: the volatile constituent. Part. I. Section C. **Journal of the Chemical Society**, v.35, p. 2598-2599, 1967.

PINTO, A. C.; SIQUEIRA SILVA, D. H.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos Naturais: Atualidades, Desafios e Perspectivas. **Química Nova**, v.25, Suplemento 1, p.45-61, 2002.

PLETSCH, M. Compostos naturais biologicamente ativos. **Biotecnologia: Ciência & Desenvolvimento**. v.1, n.4, p.12-15, 1998.

PRING, B. G. Isolation and identification of amides from *P. callosum* synthesis of pipercallosine and pipercallosidine. **Journal of the Chemical Society** (Perkin Transaction), v.1, p.1493–1498, 1982.

QUIRINO, V. F.; SZEREMETA, B.; GRIGOLETTI JR, A.; AUER, C. G. Efeito do extrato aquoso de folhas de seis espécies florestais sobre a germinação e crescimento micelial de *Cylindrocladium spathulatum* e *Colletotrichum* sp. **Revista Summa Phytopathologica**, v. 1, n. 1, p. 1-3, 1999.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Farmacologia**. 5.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. 561p.

RAMACHANDRA RAO, S.; RAVISHANKAR, G. A. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites, **Biotechnology Advances**, v.20, p. 101-153, 2002.

REIS, M. O. R. **Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato hidroalcoólico das folhas de *Persea gratissima* Gaertn – Abacateiro – (Lauraceae)**. 2006. 76f. Dissertação (Mestrado em Promoção da Saúde) -

Universidade de Franca, Franca.

REYES, F. G. R.; SCANLAN, R. A. N-nitrosaminas: formação e ocorrência em alimentos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.18, p.299-309, 1984.

RODRIGUES, F. C. M. P.; LOPES, B. M.; Potencial alelopático de *Mimosa caesalpinaefolia* Benth sobre sementes de *Tabebuia alba* (Cham.) Sandw. **Floresta e Ambiente**, v.8, n.1, p.130-136, 2001.

RODRIGUES, F. E. **Constituintes químicos de *Picrolemma granatensis*, *Simarouba tulae* e *Simaba cuneata* (Simaroubaceae)**. 1992. 221p. Tese (Doutorado em Química) – UFSCar, São Carlos.

ROMEIRO, R. S. **Métodos em Bacteriologia de Plantas**. Viçosa: Ed. UFV, 2001. 279 p.

ROZWALKA, L. C. **Controle da antracnose em frutos de goiabeira, em laboratório**. 2003. 45f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

SAEKI, Y.; ITO, Y.; SHIBATA, M.; SATO, Y.; TAKAZOE, I.; OKUDA, K. Antimicrobial action of green tea extract flavono flavor and copper cholrophyll against oral bacteria. **The Bulletin of Tokyo Dental College**, v.34, n.1, p.33-37, 1993.

SÁEZ, J.; GRANADOS, H.; ESCOBAR, G.; CARDONA, W.; ATEHORTUA, L.; CALLEJAS, R.; CORTES, D.; GONZALEZ, C. Piperlonguminina y estigmasterol, compuestos de raíces y tallos de *Piper auritum*, actividad insecticida de extractos. **Revista Colombiana de Química**, v.27, n.1, 1998.

SAITO & CO Programa Letal.exe, versão 1.3, **Software & Shareware**. 1991.

SAKURADA, T.; KATSUMATA, K.; TAN-NO, K.; SAKURADA, S.; KISARA, K. The capsaicin test in mice for evaluating tachykinin antagonists in the spinal cord.

Neuropharmacology, v. 31, p.1279-1285, 1992.

SANTOS, A. S.; ALVES, S. M.; FIGUEIREDO, F. J. C.; ROCHA NETO, O. G. Descrição de sistema e de métodos de extração de óleos essenciais e determinação de umidade de biomassa em laboratório. **Comunicado Técnico**. Belém, PA. v.99, p.1-3, Novembro, 2004a. São Luís – MA ISSN 1517-2244

SANTOS, B. R.; PAIVA, R.; CASTRO, E. M.; CARDOSO, M. G.; REZENDE, R. K. S.; PAIVA, P. D. O. Aspectos da anatomia e do óleo essencial em folhas de pindaíba (*Xylopia brasiliensis* Spreng.) **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28, n. 2, p. 345-349, 2004b.

SANTOS, P. R. D; MOREIRA, D.L.; FRANKLIN GUIMARÃES, E.; KAPLAN, M. A. C. Essential oil analysis of 10 Piperaceae species from the Brazilian Atlantic Forest. **Phytochemistry**, v.58, p. 547-551, 2001.

SCHLOMAN JR.; HILTON, A. S.; MCGRADY, J. J. Allelopathic response of vegetables to guayule residue. **Bioresource Technology**, v.35, n.2, p.191-196, 1991.

SCOTT, I. M.; JENSEN, H.; SCOTT, J. G.; ISMAN, M. B.; ARNASON, J. T.; PHILOGÈNE, B. J. R. Botanical insecticides for controlling agricultural pests: piperamides and the Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera: Chrysomelidae). **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v.54, p.212–225, 2003.

SIDDIQUI, B. S.; GUIZAR, T.; MAHMOOD, A.; BEGUM, S.; KHAN, B.; RASHEED, M.; AFSHAN, F.; TARIQ, R. M. Phytochemical studies on the seed extract of *Piper*

nigrum Linn. **Natural Product Research**, v.19, n.7, p.703-712, 2005.

SILVA, D. D.; CHIERICE, G. O.; GALHIANE, M. S.; CHAAR, J. S.; MOUCHREK-FILHO, V. E. Quantificação do linalol no óleo essencial da *Aniba duckei* Korstermans utilizando uma nova coluna capilar polyh4-md em cromatografia gasosa. **Química Nova**, v.26, n.4, p.461-465, 2003.

SILVA, L. C. **Toxicologia dos alimentos**. Alegre: ES: Texto disponibilizado em www.agais.com, 2005 (Extensão). Acessado em 20/06/2006.

SILVA, R. V.; NAVICKIENE, H. M. D.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; MEDA, C. I.; YOUNG, M. C.; FURLAN, M. Antifungal amides from *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**, v.59, p.521-527, 2002.

SIMAS, N. K.; LIMA, E. C.; CONCEIÇÃO, S. R.; KUSTER, R. M.; OLIVEIRA FILHO, A. M.; LAGE, C. L. S. Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue – atividade larvicida de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. **Química Nova**, v.27, n. 1, p.46-49, 2004.

SINGH., S. K.; PRASAD, A K.; OLSEN, C. E.; JHA, A.; JAIN, S. C.; PARMAR, V. S.; WENGEL, J. Neolignans and alkaloids from *Piper argyrophyllum*. **Phytochemistry**, v.43, n.6, p. 1355-1360, 1996.

SOUZA, M. M.; BELLA CRUZ, A.; SCHUHMACHER, M. B.; KREUGER, M. R. O.; FREITAS, R. A.; CRUZ, R. C. B. Métodos de avaliação de atividade biológica de produtos naturais e sintéticos. In: BRESOLIN, T. M. B.; CECHINEL FILHO, V. (Org.). Ciências Farmacêuticas: Contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos. Itajaí: Ed. UNIVALI, 2003, 239p. : il.

SOYAMA, Paula. Plantas medicinais são pouco exploradas pelos dentistas. **Ciência e Cultura**. v. 59, n. 1, p.12-13, 2007.

STANGARLIN, J. R., SCHWAN-ESTRADA, K. R. F., SILVA CRUZ, M. E.; NOZAKI, M. H. Plantas Medicinais e Controle Alternativo de Fitopatógenos. **Biotecnologia: Ciência & Desenvolvimento**, ano II, n. 11, p. 16-21, nov./dez., 1999.

SUBHADHIRASAKUL, S. AND PECHPONGS, P. A terpenoid and two steroids from the flowers of *Mammea siamensis* Songklanakarin **Journal of Science and Technology**, v. 27, Suppl. 2, p. 555-561, 2005.

TUKEY JUNIOR, H.B. Implications of allelopathy in agricultural plant science. **Botanical Review**, v.35, p.1-16, 1969.

TURAZI, C. M. V.; JUNQUEIRA, A. M. R.; OLIVEIRA, S. A.; BORGIO, L. A. Acúmulo de nitrato em alface em função da adubação, horário de colheita e tempo de armazenamento. **Horticultura brasileira**, v.24, n.1, p.65-70, 2006.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, D. J. A generalization of the retention index system including liner temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography**, v.11, p.463-467, 1963.

VIANNA, J. N. S. **Potencial das Energias Alternativas para o Desenvolvimento Sustentável do Nordeste - Contribuição do Biodiesel**. In: X Encontro da Rede Luso Brasileira de Estudos Ambientais, 2006, Recife. X Encontro da Rede Luso Brasileira de Estudos Ambientais, 2006.

VICKERY, M. L.; VICKERY, B. **Secondary plant metabolism**. Hong Kong: The Macmillan Press Ltd., 1981.

VOGEL, H. G. **Drug Discovery and Evaluation Pharmacological Assays**. 2nd XLIV, 2002, 1408 p.

WELTZIEN, H. C. Ein biologischer test für fungizide substanzen auf dem papierchromatogramm. **Naturwissenschaften**, v. 45, p. 288-289, 1958.

WU, S.; SUN, C.; PEI, S.; LU, Y.; PAN, Y. Preparative isolation and purification of amides from the fruits of *Piper longum* L. by upright counter-current chromatography and reversed-phase liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.1040, p.193–204, 2004.

YUNCKER, T. C. The Piperaceae of Brazil. **Hoehnea**, v.3, p. 121-3, 136-8, 1973.

ZONTA, E. P.; MACHADO, A. A.; SILVEIRA JÚNIOR, P. Sistema de Análise Estatística para Microcomputadores. **SANEST**. Pelotas, RS. UFPEL, 1984. 2 disquetes; 3^{1/2} pol. Programa Estatístico para Microcomputadores.